



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids en la rata. Estudis "in vivo" i "in vitro"

Octavi Viñas i Folch

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids en la rata. Estudis "in vivo" i "in vitro"

Octavi Viñas i Folch

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA I FISIOLOGIA
UNITAT DE BIOQUIMICA I BIOLOGIA MOLECULAR B
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

PAPER DELS ERITRÒCITS EN EL FLUX INTERÒRGANS D'AMINOÀCIDS
EN LA RATA. ESTUDIS "IN VIVO" I "IN VITRO".

MEMÒRIA QUE PER OPTAR AL GRAU DE
DOCTOR EN CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
PRESENTA N.º

OCTAVI VIÑAS I FOLCH

BARCELONA, NOVEMBRE DE 1986

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700184227



L'INTERESSAT

Octavi Viñas i Folch

OCTAVI VIÑAS I FOLCH

VIST I PLAU DEL DIRECTOR



DR. XAVIER REMESAR I BETLLOCH
PROFESSOR TITULAR DE BIOQUIMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR

Aquest treball ha estat realitzat a la Càtedra de Fisiologia General de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, actualment Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular B del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Universitat de Barcelona.

Amb aquestes línies voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han fet possible la realització d'aquest treball.

Als Drs. Emilio Herrera, Miquel Llobera i Marià Alemany que han dirigit de forma consecutiva aquesta Unitat per permetre i encoratjar la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

Al Dr. Xavier Remesar per la seva direcció i comprensió. A en Marçal Pastor pel seu interès i les hores que ha perdut amb mi discutint aspectes diversos d'aquest treball i de moltes altres coses i per la seva amistat. A la Dra. Geneviève Bourdel del Centre de Recherches sur la Nutrition de París pels seus comentaris sobre punts importants d'aquesta memòria.

A l'Antonio Felipe pel seu inestimable ajut en una part molt important d'aquest treball.

A en Francesc Villarroya per tantes hores passades de bona companyia i la seva amistat.

I a tots el altres membres de la Càtedra pel seu ajut i per haver tingut la paciència d'aguantar-me durant tots aquests anys i als que demano disculpes per deixar-los en l'anonimat.

I a la família, que mostra sempre la seva fortalesa, en moments de tristó i d'alegria. I molt especialment a en Jordi. La seva absència m'ha fet replantejar tantes coses.... A ell, "in memoriam"

Moltes gràcies a tots

<u>I. INTRODUCCIO</u>	1
<u>I.1. FLUX INTERORGANS D'AMINOACIDS</u>	1
<u>I.1.1. Intestí</u>	3
<u>I.1.1.1 Absorció d'aminoàcids</u>	4
<u>I.1.1.2 Síntesi de proteïnes</u>	9
<u>I.1.1.3 Contribució de l'intestí als fluxos interòrgans</u> <u>d'aminoàcids</u>	10
<u>I.1.2 Fetge</u>	13
<u>I.1.3 Múscul</u>	19
<u>I.1.4 Ronyó</u>	23
<u>I.1.5 Cervell</u>	27
<u>I.2. SON ELS ERITROCITS UNA VIA DE TRANSPORT</u> <u>D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS?</u>	30
<u>I.3. TRANSPORT D'AMINOACIDS EN ERITROCITS I</u> <u>RETICULOCITS "IN VITRO"</u>	41
<u>I.3.1. Transport d'aminoàcids neutres</u>	42
<u>I.3.2. Transport d'aminoàcids bàsics</u>	50
<u>I.3.3. Transport d'aminoàcids àcids</u>	51
<u>II. OBJECTIUS</u>	52
<u>III. MATERIALS I METODES</u>	56
<u>III.I PART 1: CONTRIBUCIO DELS ERITROCITS EN EL</u> <u>TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS</u> ...	57
<u>III.1.1. Plantejament experimental</u>	57
<u>III.1.2. Animals</u>	57
<u>III.1.2.2 Dieta</u>	58
<u>III.1.2.3 Obtenció de mostres</u>	58
<u>III.1.4 Tractament de les mostres</u>	60
<u>III.1.5 Determinació de l'hematocrit</u>	60
<u>III.1.6 Determinació d'aminoàcids lliures</u>	61
<u>III.1.7 Càlcul de la compartimentació sanguínia i de la</u> <u>concentració intracel.lular d'aminoàcids</u>	64
<u>III.1.8 Comprovació de l'estat dels animals</u>	66
<u>III.1.9 Mesura del flux sanguini</u>	70
<u>III.1.10 Càlcul del balanç net d'aminoàcids</u>	73

<u>III.2 PART 2: TRANSPORT D'AMINOACIDS EN ERITROCITS</u>	
<u>"IN VITRO"</u>	76
<u>III.2.1 Plantejament experimental</u>	76
<u>III.2.2 Obtenció dels eritròcits</u>	76
<u>III.2.3 Rentat dels eritròcits</u>	76
<u>III.2.4 Medis</u>	77
<u>III.2.5 Buidament d'aminoàcids</u>	78
<u>III.2.6 Diferents paràmetres estudiats en els eritròcits</u> ..	78
III.2.6.1 Hematòcrit i aigua intracel.lular.....	81
III.2.6.2 Densitat de les cèl.lules.....	81
III.2.6.3 Determinació d'hemoglobina.....	81
III.2.6.4 Comptatges cel.lulars.....	83
III.2.6.5 Determinació de la GOT.....	83
III.2.6.6 Determinació de la GPT.....	84
III.2.6.7 Mesura de la concentració d'ATP intracel.lular..	85
<u>III.2.7 Mesura del transport d'aminoàcids</u>	87
III.2.7.1 Captació en funció del temps (overshoot).....	88
III.2.7.1.1 Medis d'incubació.....	88
III.2.7.1.2 Incubació.....	89
III.2.7.1.3 Mesura del blanc.....	93
III.2.7.1.4 Prova de l'adsorció sw membrana.....	94
III.2.7.1.5 Comprovació del mètode.....	95
III.2.7.2 Captació d'aminoàcids en funció de la concentració (cinètica).....	95
III.2.7.2.1 Estudis d'inhibicions.....	97
III.2.7.2.2 Estudi de la dependència al Cl ⁻ del transport de glicina.....	97
III.2.7.3 Càlculs i expressió dels resultats.....	98
<u>III.3 PART 3: TRANSPORT D'AMINOACIDS EN RETICULOCITS</u>	
<u>"IN VITRO"</u>	100
<u>III.3.1 Plantejament experimental</u>	100
<u>III.3.2 Obtenció de reticulòcits</u>	100
<u>III.3.2.1 Procediment</u>	100
<u>III.3.3 Diferents paràmetres estudiats en reticulòcits</u> ...	101
<u>III.3.4 Mesura del transport d'aminoàcids</u>	101

III.3.4.1	<u>Estudis de la influència del pH del medi sobre el transport de glutamina i alanina.....</u>	102
III.4	<u>PART 4: CONTRIBUCIO DELS RETICULOCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS....</u>	103
III.4.1	<u>Plantejament experimental.....</u>	103
III.4.2	<u>Procediment.....</u>	103
III.5	<u>COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT.....</u>	105
III.5.1	<u>Aspectes generals.....</u>	105
III.5.2	<u>Liquid d'escintil.lació.....</u>	105
III.5.3	<u>Càlcul de les dpm.....</u>	105
III.5.4	<u>Corba d'eficiència per a ^{14}C.....</u>	106
III.5.5	<u>Corba d'eficiència per ^3H.....</u>	107
III.6	<u>ESTADISTICA.....</u>	108
IV	<u>RESULTATS.....</u>	109
IV.1	<u>PART 1: CONTRIBUCIO DELS ERITROCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS....</u>	110
IV.1.1	<u>Paràmetres hemàtics i fluxos sanguinis.....</u>	110
IV.1.2	<u>Concentració d'aminoàcids en l'artèria: sang i compartimentació sanguinia.....</u>	113
IV.1.3	<u>Balanç d'aminoàcid dels teixits drenats per la vena porta.....</u>	116
IV.1.4	<u>Balanç hepàtic d'aminoàcids.....</u>	119
IV.1.5	<u>Balanç esplàncnic d'aminoàcids.....</u>	122
IV.1.6	<u>Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena il.líaca.....</u>	125
IV.1.7	<u>Balanç renal d'aminoàcids.....</u>	125
IV.1.8	<u>Balanç d'aminoàcids del teixits drenats per la vena jugular.....</u>	128
IV.2	<u>PART 2: TRANSPORT D.'AMINOACIDS EN ERITROCITS "IN VITRO".....</u>	134
IV.2.1	<u>Comprovació del mètode.....</u>	134
IV.2.2	<u>Transport de L-alanina.....</u>	134
IV.2.3	<u>Transport de glicina.....</u>	143
IV.2.4	<u>Transport de L-leucina.....</u>	149
IV.2.5	<u>Transport de L-glutamina.....</u>	155

<u>IV.2.6</u>	<u>Transport de L-prolina.....</u>	158
<u>IV.2.7</u>	<u>Transport de L-lisina.....</u>	158
<u>IV.2.8</u>	<u>Transport de L-glutamat.....</u>	163
<u>IV.3</u>	<u>PART 3: TRANSPORT D'AMINOACIDS EN RETICULOCITS</u>	
	<u>"IN VITRO".....</u>	166
<u>IV.3.1</u>	<u>Obtenció de reticulòcits i nivells d'ATP</u>	
	<u>intracel.lular durant els rentats i incubació.....</u>	166
<u>IV.3.2</u>	<u>Transport de L-alanina.....</u>	166
<u>IV.3.3</u>	<u>Transport de glicina.....</u>	174
<u>IV.3.4</u>	<u>Transport de L-glutamina.....</u>	180
<u>IV.3.5</u>	<u>Transport de L-leucina.....</u>	187
<u>IV.3.6</u>	<u>Transport de L-glutamat.....</u>	187
<u>IV.4</u>	<u>PART 4: CONTRIBUCIO DELS RETICULOCITS AL TRANSPORT</u>	
	<u>"IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS.....</u>	194
<u>IV.4.1</u>	<u>Paràmetres hemàtics i fluxos sanguinis.....</u>	194
<u>IV.4.2</u>	<u>Concentració d'aminoàcids en l'artèria: sang</u>	
	<u>i compartimentació sanguinia.....</u>	197
<u>IV.4.3</u>	<u>Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la</u>	
	<u>vena porta.....</u>	200
<u>IV.4.4</u>	<u>Balanç hepàtic d'aminoàcids.....</u>	200
<u>IV.4.5</u>	<u>Balanç esplàncnic d'aminoàcids.....</u>	203
<u>V</u>	<u>DISCUSSIO.....</u>	204
<u>V.1</u>	<u>PART 1: CONTRIBUCIO DELS ERITROCITS AL TRANSPORT</u>	
	<u>"IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS.....</u>	205
<u>V.1.1</u>	<u>Paràmetres hemàtics i estat dels animals.....</u>	205
<u>V.1.2</u>	<u>Discussió del mètode.....</u>	205
<u>V.1.3</u>	<u>Compartimentació sanguinia d'aminoàcids i</u>	
	<u>concentració en eritròcits i plasma.....</u>	207
<u>V.1.4</u>	<u>Balanç intetinal d'aminoàcids.....</u>	208
<u>V.1.5</u>	<u>Balanç hepàtic d'aminoàcids.....</u>	215
<u>V.1.6</u>	<u>Balanç esplàncnic d'aminoàcids.....</u>	222
<u>V.1.7</u>	<u>Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per</u>	
	<u>la vena i.líaca.....</u>	227
<u>V.1.8</u>	<u>Balanç renal d'aminoàcids.....</u>	232

<u>V.1.9</u>	<u>Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular.....</u>	235
<u>V.1.10</u>	<u>Consideracions globals.....</u>	238
<u>V.2</u>	<u>PART 2: TRANSPORT D'AMINOACIDS EN ERITROCITS</u>	
	<u>"IN VITRO".....</u>	240
<u>V.2.1</u>	<u>Condicions i validesa del mètode emprat en la mesura "in vitro" del transport d'aminoàcids.....</u>	240
<u>V.2.2</u>	<u>Transport d'alanina.....</u>	241
<u>V.2.3</u>	<u>Transport de glicina.....</u>	245
<u>V.2.4</u>	<u>Transport de leucina.....</u>	247
<u>V.2.5</u>	<u>Transport de glutamina.....</u>	251
<u>V.2.6</u>	<u>Transport de prolina.....</u>	254
<u>V.2.7</u>	<u>Transport de lisina.....</u>	255
<u>V.2.8</u>	<u>Transport de glutamat.....</u>	256
<u>V.3</u>	<u>PART 3: TRANSPORT D'AMINOACIDS EN RETICULOCITS</u>	
	<u>"IN VITRO".....</u>	258
<u>V.3.1</u>	<u>Obtenció de reticulòcits.....</u>	258
<u>V.3.2</u>	<u>Transport d'alanina.....</u>	259
<u>V.3.3</u>	<u>Transport de glicina.....</u>	260
<u>V.3.4</u>	<u>Transport de glutamina.....</u>	261
<u>V.3.5</u>	<u>Transport de leucina.....</u>	263
<u>V.3.6</u>	<u>Transport de glutamat.....</u>	264
<u>V.3.7</u>	<u>El transport d'aminoàcids en funció de la maduració de reticulòcit a eritròcit.....</u>	264
<u>V.4</u>	<u>PART 4: CONTRIBUCIO DELS "RETICULOCITS" AL TRANSPORT</u>	
	<u>"IN VIVO" D'AMINOACIDS ENTRE ELS ORGANS.....</u>	267
<u>V.4.1</u>	<u>Estat dels animals.....</u>	267
<u>V.4.2</u>	<u>Compartimentació sanguínia d'aminoàcids i relació de concentracions cèl.lules/plasma.....</u>	267
<u>V.4.3</u>	<u>Balanç intestinal d'aminoàcids.....</u>	269
<u>V.4.4</u>	<u>Balanç hepàtic d'aminoàcids.....</u>	270
<u>V.4.5</u>	<u>Balanç esplàncnic d'aminoàcids.....</u>	271
<u>V.5.</u>	<u>CONSIDERACIONS GLOBALES. INTEGRACIO DELS REULTATS....</u>	272
<u>VI.</u>	<u>CONCLUSIONS.....</u>	276
<u>VII.</u>	<u>BIBLIOGRFIA.....</u>	278

I. INTRODUCCIÓ

I.1. FLUX INTERÒRGANS D'AMINOÀCIDS.

Encara avui és corrent considerar que la nutrició d'organismes pluricel.lulars segueix el mateix model que per organismes unicel.lulars, és a dir que l'aliment absorbit pel tracte digestiu es reparteix entre les diferents cèl.lules de l'organisme de forma homogènia, com si entre aquestes no hi haguèssin diferències funcionals, i així es sol donar molta importància a la classificació dels aminoàcids entre essencials -aquells que l'organisme pot sintetitzar en quantitats suficients- i els no essencials -aquells que no els pot sintetitzar, ó no ho fa de manera suficient. Obviament, l'existència d'un organisme animal pluricel.lular comporta l'existència d'una gran especialització funcional, i per tant estructural, dels diferents teixits i òrgans que el componen, donant lloc, per tant, a una gran diversificació de capacitats i característiques metabòliques i, com a conseqüència d'això, de necessitats de nutrients específiques segons els grups de cèl.lules. Així, un nutrient que no és essencial per l'organisme entés com un tot, si que pot ser-ho per una cèl.lula -grup de cèl.lules- determinada, i a més a més, aquesta necessitat pot ser variable segons l'estat fisiològic de l'organisme. Aquesta especialització metabòlica dels diferents grups de cèl.lules de l'organisme implica que els nutrients que arribin a una determinada cèl.lula siguin el resultat de molts factors: de la composició de la dieta i de l'alteració que s'esdevé en major ó menor grau en la composició de nutrients de la sang en passar pels diferents teixits de l'organisme. Per tant, alteracions fisiològiques ó patològiques que afectin a òrgans i teixits concrets poden tenir incidència en zones anatòmicament molt allunyades d'aquests, com succeeix, per exemple, en casos de malfuncionament hepàtic que poden comportar alteracions en la síntesi de dopamina i

catecolamines en el cervell (encefalopatia hepàtica). Aquesta necessitat de fluxos entre els òrgans de nutrients potser resultin més clars, i estudiats, per la glucosa i els cossos cetònics. Però fins i tot en aquests casos encara no estan plenament definits, ni de bon troç, els processos reguladors homeostàtics d'aquests fluxos. Des d'aquesta perspectiva no resulta estrany que la situació sigui molt més fosca pel cas dels aminoàcids, donat que són més de vint compostos diferents tant en estructura com en funció.

Aquesta introducció, doncs, estarà més orientada a la relació entre els òrgans del flux d'aminoàcids que no pas a una revisió exhaustiva de les vies metabòliques d'aquests compostos.

I.1.1. Intestí.

La interpretació del paper de l'intestí en el flux interòrgans d'aminoàcids ha anat evolucionant en els últims anys a mesura que s'ha anat descobrint algunes característiques específiques d'aquest òrgan en el metabolisme d'aminoàcids. Així, ha passat d'ésser un simple pas en el flux d'aminoàcids de la dieta cap a la circulació de l'animal -i per tant, cap a les altres cèl.lules de l'organisme- a tenir un paper regulador de la qualitat i de la quantitat d'aminoàcids que realment allibera a la circulació.

Les proteïnes de la dieta són la principal font de components nitrogenats de l'organisme. No obstant, en animals rumugadors s'ha de tenir en compte la important contribució de la flora microbiana del rumen en l'aport de proteïnes. En animals monogàstrics, una font també molt important són les proteïnes endògenes provinents de les glàndules salivals, de l'estòmac, intestí, conductes

biliars, pàncreas etc., les quals poden sumar en humans uns 50-60 grams de proteïna per dia, la qual cosa representa un 30-50 % del total de proteïnes que entren a la llum intestinal (Freeman i Kim, 1978). El destí d'aquestes proteïnes en la llum intestinal és llur hidròlisi, mitjançant les 13 peptidases descrites en el "brush-border" (Alpers, 1986), a aminoàcids lliures, i també a una certa proporció de pèptids curts (de 2 a 4 aminoàcids) que escapen a la digestió. Aquests productes de la hidròlisi luminal i del "brush-border" són transportats per diferents mecanismes presents en totes les cèl.lules del "brush-border" intestinal. Un cop dins dels enteròcits, els aminoàcids són degradats, metabolitzats a d'altres aminoàcids, incorporats a proteïnes ó alliberats intactes a la sang portal.

I.1.1.1. Absorció d'aminoàcids

L'intestí prim és el lloc primari de l'absorció de glucosa i d'aminoàcids cap a la sang. Aquests soluts són transportats per tres processos: difusió simple, difusió facilitada i transport actiu. La difusió simple succeeix per vies paracel.lulars i cel.lulars, mentre que el transport (tant l'actiu com la difusió facilitada) només s'esdevenen a través de la cèl.lula (Stevens i col., 1982). El transport a través de l'enteròcit comprèn: a) captació de la llum intestinal a través de la membrana del "brush-border". b) difusió a través del citoplasma i c) sortida a la sang portal a través de la membrana basolateral. La membrana del "brush-border" té propietats transportadores úniques, mentre que les membranes basolaterals són molt similars a les membranes plasmàtiques de cèl.lules no epitelials. A continuació farem una breu descripció del transport en aquests dos tipus de membranes.

-Membranes del "brush-border". Difusió passiva.

Treballs on s'han estudiat els coeficients de permeabilitat dels diferents aminoàcids a través de la membrana del "brush-border" intestinal han mostrat que existeix una gran similitud entre la seqüència ordenada que s'obté per aquestes membranes respecte a membranes no epitelials (Stevens i col., 1982). Per exemple, la fenilalanina (aminoàcid neutre lipofílic) difon molt més ràpidament ($P=1.4 \mu\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), en conill, que la lisina (aminoàcid catiònic) ($P=0.6$). La seqüència mesurada seria fenilalanina > β -alanina > manitol > alanina > Me-AIB > prolina > glicina > lisina (Stevens i col., 1982).

-Membranes del "brush-border". Sistemes de transport.

Hi ha diferències específiques quan a la presència de diferents sistemes de transport d'aminoàcids en la membrana luminal de l'intestí, i per altra banda, tampoc existeix acord en la descripció d'aquests sistemes dins d'una mateixa espècie.

Munck (1985a,b) descriu 5 sistemes de transport en l'ileum de conill:

- 1) Sistema dependent de sodi d'alta afinitat que transporta aminoàcids neutres, i no accepta aminoàcids catiònics, ni iminoàcids, ni aminoàcids que no siguin α -aminoàcids.
- 2) Sistema dependent de sodi d'alta afinitat que transporta aminoàcids neutres i catiònics, i que no accepta aminoàcids que no siguin α -aminoàcids, ni iminoàcids.
- 3) Sistema dependent de sodi de baixa afinitat per aminoàcids neutres i catiònics, que no accepta ni no- α -

aminoàcids ni iminoàcids.

4) Sistema dependent de sodi d'afinitat intermèdia per iminoàcids, i que és de baixa afinitat per aminoàcids neutres, i no accepta aminoàcids catiònics ni no- α -aminoàcids.

5) Sistema independent de sodi d'alta afinitat per aminoàcids neutres i catiònics, que no accepta no- α -aminoàcids.

No obstant, Stevens i col. (1984), treballant amb vesícules de membrana luminal d'ileum de conill, troben també la presència de 5 sistemes de transport d'aminoàcids, però els defineixen d'una altra manera: Per aquests autors existeixen 2 sistemes independents de sodi, semblants als descrits en altres tipus cel·lulars.: Un sistema L per aminoàcids neutres, amb preferència pels aminoàcids lipofílics com la fenilalanina, leucina i l'anàleg BCH (àcid hemihidrat 2-amino-2-norbonanecarboxilic) emprat precisament per a la caracterització del sistema L en cèl·lules d'Ehrlich (Christensen, 1979). El segon sistema transporta aminoàcids catiònics com lisina (Murer i Kinne, 1980), anomenat sistema Ly^+ en cèl·lules no epitelials (White i Christensen, 1980).

Apart d'aquests dos sistemes no dependents de sodi, existirien 3 sistemes dependents de Na^+ únicament presents en la membrana del "brush-border" intestinal i no descrits en altres cèl·lules no epitelials. Aquests sistemes serien: 1) sistema NBB (Neutral Brush Border) per a la majoria d'aminoàcids neutres (principalment aquells que són zwitterions a pH:7.5) i mostra una certa interacció amb BCH. Aquest sistema no interacciona amb MeAIB (àcid metil-aminoisobutíric) i per això no es tracta del sistema A; i tampoc no és el sistema ASC ja que transporta glicina i fenilalanina. 2) sistema PHE per fenilalanina i metionina

principalment. 3) sistema IMINO, el qual exclusivament transporta iminoàcids (prolina, hidroxiprolina) i MeAIB. Encara que aquest sistema IMINO sigui l'únic transportador de MeAIB en membranes del "brush-border", és diferent del sistema A ja que exclou l'alanina i altres aminoàcids de cadena curta.

-Importància relativa de les diferents vies

Diferents treballs de Munck (1985a) i Stevens (1984) han abordat el fer una comparació entre la importància de la difusió passiva en front de la captació mitjançant transport. Per exemple, en vesícules de membranes del "brush-border" d'ileum de conill s'ha calculat que la fenilalanina és captada via difusió ($P=1.4 \mu\text{l}/\text{mg}/\text{min}$), via sistemes independents de sodi ($K_m:0.3 \text{ mM}$; $V_{m\grave{a}x}:1.8 \text{ nmols}/\text{mg}/\text{min}$) i via sistemes dependents de sodi ($K_m:9\text{mM}$; $V_{m\grave{a}x}:37 \text{ nmols}/\text{mg}/\text{min}$). A una concentració de 2.5 mM la captació via difusió és aproximadament un 25% de la captació total, el mateix percentatge que per la via de sistemes independents de sodi. A 17 mM la difusió supera a les altres dues vies d'entrada de l'aminoàcid. Per tant, la difusió simple és una via significativa d'entrada d'aminoàcids, si bé, a concentracions baixes, predominen les vies mitjançant sistemes de transport.

-Membranes basolaterals

Com ja hem comentat anteriorment les membranes basolaterals de l'intestí presenten unes propietats de transport similars a les trobades de forma quasi general en membranes no epitelials. Així, s'han descrit processos de difusió passiva, sistemes independents de sodi i sistemes dependents de sodi dels tipus descrits en altres cèl.lules. Apart d'aquesta diferència entre les membranes del "brush-

border" i les basolaterals de l'intestí quant a l'especificitat dels sistemes descrits en les primeres i la universalitat dels sistemes descrits en les segones, també destaca el fet de que en la membrana basolateral predominen els sistemes independents de sodi, mentre que en les del "brush-border" són sistemes dependents de sodi els majoritaris (Hopfer i col., 1976; Murer i Kinne, 1980; Schafer i Barfuss, 1980).

-Difusió passiva

La membrana basolateral és més permeable als aminoàcids que la membrana del "brush-border". Per exemple, la permeabilitat per l'alanina és de l'ordre de 4.5 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{min}$. en la membrana basolateral (Mircheff i col., 1980) i de l'ordre de 1 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{min}$. en la membrana del "brush-border" (Stevens i col., 1982). Aquesta característica s'interpreta com una facilitat per a que els aminoàcids que s'acumulen en l'enteròcit, provinents de la llum intestinal, puguin difondre fàcilment cap a la sang (Stevens i col., 1984). Interpretació, per altra banda, consistent amb observacions autorradiogràfiques del teixit intacte (Paterson i col., 1982).

-Sistemes independents de sodi

El sistema L és el més important transportador dels aminoàcids neutres (Hopfer i col., 1976; Mircheff i col., 1980). Per l'alanina, el sistema L és el predominant, contribuint aproximadament al 50% del flux total entre un marge de concentracions de 0.5-1 mM. Per sobre de 1mM predomina la difusió.

-Sistemes dependents de sodi

Malgrat la importància quantitativa que tenen els sistemes independents de sodi en el transport d'aminoàcids neutres en la membrana basolateral de l'intestí, Mircheff i col. (1980) demostraren l'existència d'un transport dependent de sodi per a l'alanina. A baixes concentracions d'alanina (<20 μM) aquesta via dependent de sodi representa un 30% del transport basolateral total del jejú. Per a concentracions d'alanina per sobre de 150 μM la contribució de la via dependent de sodi és molt poc important (<10%). Aquest petit transport dependent de sodi s'ha interpretat com un mecanisme que permet a l'enteròcit obtenir aminoàcids pel seu propi manteniment i metabolisme quan les concentracions d'aminoàcids en la llum intestinal són molt baixes (Stevens i col., 1984).

I.1.1.2. Síntesi de proteïnes.

Els aminoàcids absorbits, en sa major part, són alliberats a la sang portal per a llur distribució cap els altres teixits de l'organisme. No obstant, una part important dels productes de degradació, tant luminal com intracel.lular, de proteïnes s'usa pel manteniment del ràpid recanvi de la població d'enteròcits, i per a la considerable quantitat de proteïnes secretades que són alliberades per l'intestí prim. Aproximadament el 10% dels aminoàcids absorbits en rata són incorporats "in vitro" a proteïnes dins la mucosa intestinal (Bronk i Parsons, 1966). A més a més, sha comprovat que la mucosa de l'intestí prim de rates joves té el recanvi de proteïnes més alt de tots els teixits, essent del 136% per dia ó del 9.8% de la síntesi proteica total de l'organisme (Garlick, 1980). La polaritat de l'enteròcit també es manifesta en la font d'aminoàcids per a la síntesi de proteïnes: Alpers i Thier (1972)

comprovaren que els aminoàcids luminals eren la font per a la síntesi de proteïnes del "brush-border", mentre que els aminoàcids sistèmics ho eren de les proteïnes basolaterals. Sigui com sigui, aquesta alta taxa de recanvi proteic li confereix a l'intestí una alta capacitat d'adaptar-se a canvis de la freqüència i qualitat de la dieta (Alpers, 1986).

I.1.1.3 Contribució de l'intestí als fluxos interòrgans d'aminoàcids

Apart de la capacitat selectiva d'absorció d'aminoàcids i de l'ús que en pot fer de part d'aquests aminoàcids per a síntesi de proteïnes, l'intestí també (i principalment) pot alterar qualitativament i quantitativa la composició d'aminoàcids que allibera a la sang portal, com a conseqüència de l'actiu metabolisme d'aminoàcids que presenta.

L'estudi per diferents autors de fins a quin punt existeix correlació entre el patró d'aminoàcids portals i els aminoàcids de la dieta ha mostrat que, malgrat haver-hi deferències específiques, només es pot parlar de similitud des d'un punt de vista qualitatiu per aquells aminoàcids que no són metabolitzats en aquest teixit, principalment els aminoàcids essencials (Aikawa i col., 1973; Rémésy i col., 1978; Bourdel i col., 1981 entre d'altres), mentre que existeix una certa constància en un alliberament més alt del que correspondria, segons la concentració en les proteïnes de la dieta, de prolina, citrul.lina i alanina, i més baix per glutamina i, en alguns cassos, glutamat.

L'esquema del metabolisme d'aminoàcids intestinal es basa principalment en l'important consum de glutamina per a l'obtenció d'energia (Windmueller i Spaeth, 1974;

Windmueller, 1980). Aquests autors han demostrat, fent diferències arteriovenoses (v.porta-a.aorta) que l'intestí de diferents espècies: rata, rates sense flora intestinal, monos, gats, hámsters, capta glutamina plasmàtica (del 25 al 33% de la glutamina plasmàtica és captada a cada pas a través del teixit). També van estudiar "in vitro" el destí de la glutamina captada i comprovaren que, en perfusions d'intestí aïllat de rata, l'esquelet carbonat de la glutamina s'incorporà parcialment a material del teixit insoluble en àcid (14%), a CO₂ (57-64%), glucosa (6%), lactat (13%), citrul.lina (6%), prolina (6%), alanina (4%) i glutamat (0.4), mentre que el nitrogen de la glutamina s'allibera en forma d'amoni (38%), citrul.lina (28%), alanina (24%) i prolina (7%). Així mateix, comprovaren que la glutamina plasmàtica fou la font del 35% del total de CO₂ produït pel jejú de rates postabsortives. Aquesta utilització de glutamina ve determinada pels alts nivells d'activitat glutaminasa que té l'intestí (Windmueller, 1980). Altres estudis de Windmueller i Spaeth (1980) sobre la importància relativa de la glutamina front a la utilització de cossos cetònics i glucosa, fets en segments de jejú amb aport arterial intacte, i recullint tota la sortida venosa, mostraren que quan la llum intestinal és buida de tot residu de la dieta, del total de CO₂ produït que és derivat del metabolisme dels substrats arterials un 46% provenia de la glutamina, un 11% de l'acetoacetat i un 10% de la glucosa. Per altra banda, l'alliberament d'amoni, citrul.lina, alanina i prolina a la sang sumava un 97% del nitrogen de la glutamina metabolitzada per l'intestí. Perfundint continuament la llum intestinal amb una solució simulant la dieta, contenint 70 mM de glucosa i 20 mM de L-aminoàcids, el percentatge del total de CO₂ respirat que provenia d'aquells substrats fou: un 39% de glutamina, glutamat i aspartat de la llum intestinal, un 38% de la glutamina arterial i un 6% de glucosa luminal. Només un 3%

de la glucosa luminal transportada a través de l'intestí fou metabolitzada. Aquestes dades mostren la gran importància de la glutamina com a substrat respiratori per l'intestí en front de la glucosa.

Aquesta utilització de glutamina sembla ser, en certa forma, independent de l'estat fisiològic de l'animal. Estudis de diferències arteriovenoses mostren que l'intestí capta glutamina en rates alimentades, ja sigui amb dietes hiperproteiques (Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978; Bourdel i col., 1981) ó amb dietes hiperglucídiques (Rémésy i col., 1978). També en rates dejunades (Aikawa i col., 1973), en humans postabsortius (Felig i col., 1973), en gos (Elwyn i col., 1972) i en be (Bergman i Heitmann, 1978).

La captació de glutamina per l'intestí pot estar afectada per estats d'acidosis metabòlica. En rates acetoacidòtiques diabètiques (tractades amb estreptozotocina) l'intestí no capta glutamina (Brosnan i col., 1983; Watford i col., 1984), la qual cosa s'interpreta com un mecanisme adaptatiu per a facilitar la captació renal de glutamina que s'esdevé en aquestes situacions (Vinay i col., 1980; Heitmann i Bergman, 1980; Brosnan i col., 1980). Amb l'ús d'altres models d'acidosis metabòlica no s'ha trobat aquest efecte (Schrock i Goldstein, 1981) la qual cosa pot fer pensar que el factor que redueix la captació de glutamina per l'intestí no sigui l'estat d'acidosis "per se" sinò que podrien ser els altíssims nivells de cossos cetònics circulants que hi ha en diabetis.

La manca de dieta, el dejuni, pot provocar que l'intestí esdevingui un captador net d'aminoàcids. Així, Webber i col. (1973) han descrit que l'intestí de gos dejunat capta significativament serina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina i histidina, necessària per a

sustentar l'alta síntesi de proteïnes d'aquest teixit. Aquest efecte, però, no és del tot clar ja que Elwyn i col. (1968) no observen captació neta per l'intestí de gos dejunat. Les discrepàncies poden ser degudes al grau en que siguin absorbits aminoàcids provinents de proteïnes endògenes que emmascarin la captació intestinal mesurada per diferències arteriovenoses.

I.1.2. Fetge

Es considera que el fetge és l'òrgan que distribueix els aminoàcids cap a la resta de l'organisme. La seva situació anatòmica -l'òrgan que reb primer el flux d'aminoàcids provinents de l'intestí, i per tant de la dieta- és especialment idònia per aquesta funció. També, però, s'ha de tenir en compte la cabdal importància que té el fetge en la síntesi de proteïnes i en el metabolisme d'aminoàcids, així com en la capacitat per a formar urea (forma no tòxica d'excretar l'amoni produït en el metabolisme de compostos nitrogenats), i en l'existència en les cèl.lules d'aquest òrgan de diferents vies metabòliques, com per exemple la gluconeogènesi de la qual alguns aminoàcids són importants substrats. Òbviament, doncs, el paper del fetge en el flux interòrgans d'aminoàcids és més complex que el de simplement atemperar aquests fluxos, evitant que fluctuin excessivament com a conseqüència dels ritmes discrets en el temps de la ingesta.

La capacitat del fetge per a regular els nivells d'aminoàcids circulants, ha estat posada de manifest per Fujita i col. (1981) en estudis en els que perfundiren el fetge de rates amb solucions sense aminoàcids i analitzaren l'alliberament d'aminoàcids pel fetge. El fetge té una relació aminoàcids essencials/aminoàcids totals més baixa de la que es troba en plasma. Per tant, en un sistema tancat on

només hi ha fetge i medi de perfusió lliure d'aminoàcids, s'hauria d'esperar que la relació E/T en el medi perfundit tendís a assemblar-se a la del fetge. Es trobà, però, que aquesta relació era més semblant a la plasmàtica que a l'hepàtica: hi havia un alliberament preferencial d'aminoàcids essencials mentre que el fetge mantenia la seva E/T característica. Els aminoàcids provenien de proteïnes hepàtiques, però mentre que els aminoàcids no essencials eren catabolitzats, els essencials eren proporcionalment menys degradats i per tant alliberats en major quantia.

La captació d'aminoàcids per part del fetge és molt dependent del flux d'arribada. S'ha comprovat que el fetge de rates capta aminoàcids de forma quasi lineal a la concentració en la vena porta, en un marge de concentracions que inclouen les fisiològiques, en alimentar-les amb dietes amb continguts creixents de proteïnes (Rémésy i col., 1978). Amb dietes amb un 50% de proteïnes s'observa que el fetge extreu un 49% de l'alanina plasmàtica portal, mentre que amb dietes altes en carbohidrats i baixes en proteïnes (13%) l'extracció relativa d'alanina és del 25%. La captació d'alanina amb dietes de contingut proteic baix (13%) es realitza contra gradient (v. porta 1.29 mM i en fetge 2.36 mM), mentre que amb la dieta hiperproteica hi ha una davallada dels nivells tissulars (1.72 mM) que s'esdevé en paral·lel amb uns nivells portals més alts (2.09 mM) afavorint-se d'aquesta manera la forta captació hepàtica d'alanina que hi ha amb dietes hiperproteiques (Rémésy i col., 1978). Aquesta situació sembla extrapolable a d'altres aminoàcids, és a dir que quan hi ha un aport incrementat d'aminoàcids com a conseqüència d'una dieta hiperproteica, la concentració intrahepàtica d'aminoàcids disminueix, la qual cosa afavoreix la captació hepàtica en disminuir -i fins i tot revertir en alguns casos- el gradient de concentracions entre el plasma i l'interior de la cèl·lula.

La capacitat del fetge per atemperar els nivells circulants d'aminoàcids no és únicament una conseqüència de la seva situació fisiològica, sinó que s'ha comprovat que és una característica intrínseca al propi fetge. S'ha observat que quan s'infundeixen aminoàcids per venes perifèriques - i per tant anatòmicament molt allunyades del fetge- aquest òrgan és el responsable de la captació del 60-70% dels aminoàcids infundits, mentre que els restants, principalment aminoàcids ramificats, són captats pels teixits perifèrics (essencialment múscul) (Gelfand i col., 1986).

Per a cobrir les necessitats metabòliques i de síntesi de proteïnes, el fetge, en general, capta aminoàcids, els quals li poden arribar per dues vies diferents. En situacions d'absorció hi haurà un alliberament general d'aminoàcids per l'intestí que arribaran al fetge via vena porta. En situacions post-absortives ó de dejuni -és a dir quan l'absorció intestinal sigui molt baixa ó nul·la- els aminoàcids arribaran al fetge de forma principal via artèria hepàtica, provinents dels teixits perifèrics (majoritàriament múscul) com a conseqüència de la proteòlisi en aquests teixits (Elwyn i col., 1968; Aikawa i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; Bergman i Heitmann, 1978 entre d'altres), a més de l'aport d'alanina i amoni procedents de l'intestí (i per tant via vena porta) el qual continua utilitzant glutamina com a font energètica en aquestes situacions (Windmueller i Spaeth, 1974).

En situacions d'absorció, el destí dels aminoàcids captats pel fetge és, en general i com a vies quantitativament més importants, la oxidació i la síntesi de proteïnes.

El paper central que té el fetge en el metabolisme

d'aminoàcids li ve donat tant per la presència de la maquinària enzimàtica necessària per a oxidar a la majoria d'aminoàcids com per ser l'únic òrgan on hi ha el cicle de la urea, sistema necessari per a eliminar en una forma no tòxica l'amoni generat en el metabolisme d'aminoàcids i d'altres compostos nitrogenats. Aquesta capacitat única del fetge condiciona l'existència de vies de transport de l'amoni format en els teixits extrahepàtics al fetge. Les vies quantitativament més importants són la síntesi perifèrica d'alanina i de glutamina (Goldberg i Chang, 1978; Snell, 1980).

Un cas apart són els aminoàcids ramificats (leucina, isoleucina i valina). Els primers estudis sobre el metabolisme d'aminoàcids en el fetge perfundit i en animals hepatectomitzats mostraren que tots els aminoàcids essencials eren majoritàriament metabolitzats pel fetge amb l'excepció dels aminoàcids ramificats, els quals si bé també ho eren, el lloc principal de degradació semblava ésser els teixits no hepàtics (Miller i col., 1956). El pas inicial del catabolisme dels aminoàcids ramificats és llur transaminació amb α -cetoglutarat donant glutamat i α -cetoàcids dels aminoàcids ramificats. El següent pas és la oxidació d'aquests cetoàcids mitjançant una deshidrogenasa dels cetoàcids ramificats. S'ha comprovat que en fetge hi ha una baixa activitat transaminasa dels aminoàcids ramificats, mentre que presenta una alta activitat deshidrogenasa dels cetoàcids. El fet de que en múscul la situació sigui inversa. és a dir, alta activitat transaminasa i baixa deshidrogenasa, ha fet pensar en la possibilitat de l'existència d'un flux d'aminoàcids ramificats del fetge cap el múscul, on serien transaminats i un flux dels cetoàcids resultants del múscul al fetge on serien finalment oxidats (Wohlhueter i Harper, 1970; Shinnick i Harper, 1976; Spydevold i Hokland, 1983; Wagenmakers i col., 1985), si bé

no sembla ser aquest el cas per animals remugadors, el fetge dels quals té altes activitats d'ambdós enzims, i presenta captacions d'aminoàcids ramificats elevades (Heitmann i Bergman, 1980).

La importància del fetge en el metabolisme d'aminoàcids es posa especialment en evidència en tractar el metabolisme dels aminoàcids aromàtics. En mamífers els aminoàcids aromàtics fenilalanina i triptofan són essencials, mentre que la tirosina pot ser sintetitzada a partir de la fenilalanina, essent aquests tres aminoàcids importants per ser precursors d'amines neuroactives en el sistema nerviós central. S'ha comprovat que els enzims tirosina aminotransferasa, fenilalanina hidroxilasa i triptofan 2,3-diogenasa poden ser induïts per variats factors, tant hormonals com la pròpia concentració d'aquests aminoàcids (Young i Munro, 1973; Carr i Pogson, 1981; Nakamura i col., 1981; Haley i Harper, 1982; Salter i col., 1984 entre d'altres).

Els casos de malfuncionament hepàtic són un clar exemple de la cooperativitat i interrelacions dels diferents òrgans en el metabolisme d'aminoàcids. S'ha observat que la cirrosi del fetge pot comportar l'aparició d'encefalopaties (s'anomenen encefalopaties hepàtiques), com a conseqüència d'un augment en l'entrada d'aminoàcids aromàtics al cervell (Fischer i col., 1976), la qual cosa comporta un augment en la síntesi de catecolamines i serotonina. Aquesta incrementada captació cerebral és conseqüència directa de l'increment en la concentració circulat dels aminoàcids aromàtics degut a que el fetge no els metabolitza (Munro i col., 1975), junt a una disminució de la concentració d'aminoàcids ramificats com a conseqüència dels alts nivells d'insulina que hi ha en aquestes situacions, ja que el fetge cirròtic no la pot degradar (Fernstrom i col., 1979), la

qual estimula la captació muscular dels aminoàcids ramificats (Fulks i col., 1975; Elia i col., 1980). Donat que l'entrada al cervell tant d'aminoàcids aromàtics com de ramificats es realitza mitjançant el mateix sistema de transport (Olendorf i Szabo, 1976), l'augment circulant d'aminoàcids aromàtics combinada amb un descens de ramificats afavoreix l'entrada al cervell dels precursors de les amines neuroactives.

El fet de que el fetge sigui pràcticament l'únic òrgan amb una via gluconeogenètica funcional que comporti un aport de glucosa per l'organisme (si bé el ronyó també pot sintetitzar glucosa "de novo", només té una certa importància en casos extrems de dejuni (Owen i col., 1969)) li confereix també un paper clau en el catabolisme dels aminoàcids gluconeogenètics, principalment de l'alanina, i en segon terme de la serina i treonina (en animals remugadors són també importants substrats gluconeogenètics el glutamat i la glutamina (Bergman i Heitmann, 1978)). En situacions postabsortives o de dejuni l'alanina li arriba al fetge procedent dels teixits perifèrics i de l'intestí (Aikawa i col., 1973 entre d'altres. La capacitat dels teixits perifèrics (principalment múscul) per a sintetitzar alanina a partir del piruvat provinent de la glucosa circulant i la utilització hepàtica d'aquesta alanina per a la síntesi de glucosa, ha fet definir l'existència d'un cicle glucosa-alanina (semblant al cicle de Cori o cicle de la glucosa-lactat) entre el fetge i els teixits perifèrics (Malette i col., 1969; Felig i col., 1970). Aquest cicle, però s'ha d'entendre més com un mecanisme de transport d'amoní dels teixits perifèrics al fetge, on serà convertit en urea, que com un cicle gluconeogenètic, degut a que l'esquelet carbonat de la glucosa es recicla. L'única manera de que l'alanina contribueixi a la síntesi "de novo" de glucosa és que provingui (el seu esquelet carbonat) d'altres

aminoàcids (per a revisió vegeu Goldberg i Chang, 1978; Snell, 1980).

I.1.3. Múscul

La gran massa del múscul relativa al total del pes corporal -aproximadament un 45% (Remesar i col., 1981)- i el fet de que quasi un 60% de les proteïnes de cos estiguin en el múscul, donen a aquest teixit una importància cabdal com a reserva d'aminoàcids per a la resta de l'organisme. Hem de pensar, però, que a més a més, el múscul també té importància en el metabolisme d'aminoàcids. Ja hem comentat anteriorment que els experiments de Miller i col. (1956) demostraven que el múscul era el principal lloc de degradació dels aminoàcids ramificats, dades posteriorment confirmades per treballs "in vitro" que mostraren que diafragmes aïllats de rata eren capaços de degradar ràpidament els tres aminoàcids de cadena ramificada, així com aminoàcids no essencials com alanina, glutamat i aspartat (Manchester, 1965; Goldberg i Odessey, 1972; Odessey i Goldberg, 1972).

Mesures realitzades "in vivo", mitjançant la tècnica de les diferències arteriovenoses, i estudis "in vitro", de perfusions en humans i múscul aïllat de rata, han mostrat que el múscul, en situacions postabsortives o de dejuni, allibera aminoàcids a la circulació. L'espectre d'aminoàcids alliberats, però, no és exactament el que correspondria al resultat d'un simple hidrolitzat de proteïnes musculars, sinó que allibera molta més quantitat de glutamina i d'alanina i menor quantitat d'aminoàcids ramificats que el que li correspondria si ho fos (Felig i col., 1970; Felig i Wahren, 1971; Aikawa i col., 1973; Ruderman i Berger, 1974; Odessey i col., 1974; Garber i col., 1976a). Aquests resultats suggereixen que ha d'existir síntesi "de novo"

d'alanina i glutamina en el múscul. Per aquesta síntesi d'alanina i glutamina s'utilitzaria de forma important el nitrogen provinent de la transaminació dels aminoàcids ramificats (Ruderman i Berger, 1974; Garber i col., 1976b; Haymond i Miles, 1982). L'ús de l'amoni generat en processos metabòlics musculars per a la síntesi d'alanina i glutamina, ha fet considerar a aquesta síntesi i exportació un mecanisme destoxificador (Snell, 1980).

Si bé hi ha un acord bastant general sobre l'origen del nitrogen de l'alanina i de la glutamina, no succeeix el mateix en quan a l'origen de l'esquelet carbonat, sobretot de l'alanina. Hi ha evidències que mostren que la glucosa captada pel múscul i utilitzada via glucòlisi ret el piruvat que serà transaminat a alanina (Chang i Goldberg, 1977). Aquesta és la base del que es coneix com el cicle de la glucosa-alanina (Malette i col., 1969; Felig i col., 1970), ja que aquesta alanina alliberada serà substrat per a la via gluconeogenètica en el fetge.

S'ha considerat, però, que també els aminoàcids ramificats poden ser precursors de l'esquelet carbonat de l'alanina (Snell i Duff, 1977, 1984), hipòtesi rebutjada per Goldberg i Chang (1978). De fet, es podria pensar que en situacions d'una limitada assequibilitat de glucosa, els aminoàcids ramificats podrien contribuir a la síntesi de l'esquelet carbonat de l'alanina. En un recent treball, realitzat amb incubacions de diafragma de rata, s'arriba a la conclusió que, almenys fins a 40 hores de dejuni, la mobilització de glicogen muscular és suficient per a explicar la producció de lactat+piruvat+alanina muscular, sense que s'hagi de recórrer a la síntesi d'alanina "de novo" a partir d'intermediaris del cicle de Krebs i aminoàcids relacionats (Caldecourt i col., 1985). Pel que fa a l'esquelet carbonat de la glutamina, existeixen molts

menys treballs, però sembla clara la contribució dels aminoàcids ramificats Goldberg i Chang, 1978).

Sigui com sigui, en situacions postabsortives la suma d'alanina i glutamina alliberades pel múscul representen al voltant del 50% del total d'aminoàcids alliberats (Felig, 1975).

Malgrat que la capacitat per a transportar nitrogen sigui similar per aquests dos aminoàcids, el destí és prou diferent. Així, l'alanina és un substrat important per a la gluconeogènesi hepàtica (Felig i col., 1970), mentre que la glutamina és un precursor per a l'amoniagènesis renal (Pitts, 1964) i un substrat energètic per l'intestí prim (Windmueller i Spaeth, 1980). La glutamina és també un nutrient essencial pels limfòcits (Ardawi i Newsholme, 1983), un regulador de la síntesi de glicogen hepàtic (Katz i col., 1976) i un regulador de la degradació proteica (Schworer i Mortimore, 1979). Sembla, doncs, lògic pensar que sigui vantatjós el que l'alliberament d'aquests dos aminoàcids estigui regulat de forma independent. A aquesta conclusió s'ha arribat en observar situacions experimentals on les taxes d'alliberament d'un d'aquests aminoàcids estigui alterada respecte a l'altre. D'entrada es pot observar que en situació d'alimentació, en estat absortiu, el múscul capta alanina, ó presenta un balanç nul, mentre que existeix una sortida de glutamina muscular (Yamamoto i col., 1974; Brosnan i col., 1983), la qual cosa es pot interpretar donant a la glutamina un paper més directament relacionat amb el transport d'amoni produït en múscul, ja que en aquesta situació hi ha un actiu metabolisme d'aminoàcids ramificats en aquest teixit (Goldberg i Chang, 1978). També s'ha observat que el tractament amb altes dosis de glucagó durant 24 hores a rates dejunades produeix un augment (3 vegades) en la sortida d'alanina muscular, mentre

que no varia la sortida de glutamina (Smith, 1986). Contràriament, una situació crònica d'acidosi resulta en una sortida incrementada de glutamina muscular, però no d'alanina (Schrock i Goldstein, 1981; Brosnan i col., 1983; Smith, 1986; Welbourne, 1986).

Sembla ser que la sortida incrementada d'alanina va més lligada a un increment en el gradient de concentració intracel.lular i extracel.lular, i per tant el transport és procés limitant. La producció de glutamina, contràriament, no depèn d'aquest gradient, sinó que és més dependent de la via de síntesi (activació de la glutamina sintetasa) (Smith, 1986).

Apart de la importància energètica i de ser possibles precursors de la síntesi d'alanina i glutamina, els aminoàcids ramificats en múscul tenen la capacitat de promoure un balanç de nitrogen positiu en aquest teixit (Fulks i col., 1975; Buse i Reid, 1976). De fet, la leucina, per ella mateixa, promou la síntesi proteica i inhibeix la proteòlisi muscular. La isoleucina i la valina juntes, però no individualment, també tenen aquest efecte (Goldberg i Chang, 1978). Sembla ser que aquest increment en la síntesi de proteïnes es deu a un efecte a nivell translacional, així, s'ha vist que la leucina incrementa la formació de polisomes, i redueix el nombre de ribosomes lliures en múscul (Atwell i col., 1977). El factor que regula aquesta síntesi, però, no es coneix, si bé s'ha hipotetitzat que podria ésser el leucil_tRNA (Goldberg i Chang, 1978).

Recentment s'ha descrit que també la pròpia glutamina té un important paper inhibidor de la proteòlisi muscular en cultius de cèl.lules diferenciades de múscul esquelètic de la línia L6 (Smith, 1985, 1986).

I.1.4. Ronyó

El fet de que en estat absortiu el ronyó només extregui un 0.4% dels aminoàcids arterials que li arriben (Owen i Robinson, 1963; Tizianello i col., 1980), i en dejuni prolongat aquesta extracció arribi només al 0.8% (Felig i col., 1969) suggereix que el ronyó no té un paper important en el metabolisme global d'aminoàcids, si bé aquest teixit presenta activitats enzimàtiques per a degradar pràcticament tots els aminoàcids (Mitch i Chesney, 1983).

Els ronyons, però, utilitzen certs aminoàcids per a reaccions sintètiques importants, i tenen un paper clau en estats d'acidosi metabòlica, usant el nitrogen dels aminoàcids per a produir amoni i tamponar la disminució del pH.

Una altra capacitat importantíssima del ronyó és la reabsorció dels aminoàcids. En humans aproximadament 70 g d'aminoàcids són filtrats cada dia, però només un 2-3% són excretats, representant menys del 3% del total del nitrogen urinari (Scriver i Rosenberg, 1973). La reabsorció d'aminoàcids s'esdevé en el tub proximal per processos actius (Young i Freedman, 1971; Ullrich, 1976; Schafer i Barfuss, 1980).

El fet de que malgrat disposar de maquinària enzimàtica suficient, l'estudi de diferències arteriovenoses en situacions no acidòtiques no mostri una contribució important del ronyó en el manteniment dels nivells circulants d'aminoàcids, s'ha interpretat com que el ronyó podria tenir importància quan hi hagués un aport excessiu d'aminoàcids, com suggereixen treballs en que s'infundiren grans quantitats d'aminoàcids a gossos (Fukuda i Kopple, 1980) i en rata (Coulson i Hernández, 1968) en els que

s'observà que el ronyó extreia una gran quantitat d'aquests aminoàcids.

En situacions en que no hi hagin excessives quantitats d'aminoàcids el ronyó té un paper important en el metabolisme d'alguns aminoàcids com glicina, serina, alanina, arginina i glutamina (Tannen, 1978).

La glicina és necessària per almenys dues importants reaccions sintètiques: la síntesi de serina i la de l'àcid guanidinoacètic, presursor de la creatina que es sintetitzarà en el fetge, i quan els nivells de glicina en plasma són prou alts, aquest aminoàcid pot esdevenir una font de nitrogen per l'amoni urinari (Pitts i Pilkington, 1966). Aquests múltiples destins de la glicina podrien explicar el fet de que, en totes les espècies estudiades, s'hagi observat una captació neta d'aquest aminoàcid pel ronyó (Owen i Robinson, 1963; Felig i col., 1969; Aikawa i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; Fukuda i Kople, 1980; Tizianello i col., 1980; Brosnan i col., 1983 entre d'altres). Hi ha evidències que mostren que la glicina és el principal, sinó l'únic, precursor de la serina sintetitzada en el ronyó (Pitts i col., 1970). Aquest procés té una significació fisiològica important en el manteniment dels nivells circulants de serina, ja que en casos d'insuficiència renal hi ha una davallada d'aquests valors (Tizianello i col., 1980).

S'ha comprovat que l'alanina contribueix a la producció renal d'amoni: entre un 2-8% de l'amoni urinari deriva de l'alanina, quan els nivells plasmàtics d'aquest aminoàcid són normals. Aquesta fracció pot incrementar-se quan els valors circulants són més alts (Pitts i Stone, 1967). La contribució de l'alanina a la formació d'amoni urinari resulta una mica sorprenent, ja que estudis en

humans (Pitts i Stone, 1967; Tizianello i col., 1980), en gos (Pitts i Stone, 1967) i en rata (Yamamoto i col., 1974), han indicat que hi ha un alliberament net d'alanina a la vena renal. La mesura simultània de la producció d'amoni renal i d'alanina mostra que la taxa de producció d'alanina disminueix quan s'incrementen els nivells d'alanina plasmàtica i augmenta quan s'infundeix glutamina a l'artèria renal (Pitts i Stone 1967). Aquests resultats podrien ser explicats si l'alanina es formés per transaminació del piruvat usant glutamat ó glutamina com a donadors del grup amino. Així, la producció renal d'amoni a partir d'alanina podria succeir després de la formació del glutamat en transferir el grup amino de l'alanina a l' α -cetoglutarat (Mitch i Chesney, 1983). D'aquesta manera, l'alanina podria funcionar també en el ronyó com a transportador de nitrogen, producte del metabolisme d'aminoàcids, cap el fetge per a la síntesi d'urea.

Apart d'una piruvat-glutamat transaminasa, s'han descrit almenys unes 25 reaccions de transaminació en el ronyó (Cammarata i Cohen, 1950). Les més estudiades han estat les transaminases dels aminoàcids ramificats (Adibi, 1976), malgrat que la regulació de la via catabòlica d'aquests aminoàcids sembla que succeeix a nivell de la deshidrogenasa dels cetoàcids ramificats (Hughes i Halestrop, 1981). La gran activitat transaminàsica dels ramificats del ronyó explica les observacions de que quan es perfundeix aquest òrgan amb cetoàcids dels aminoàcids ramificats hi ha una producció neta dels aminoàcids ramificats corresponents (Mitch i Chan, 1978).

El ronyó també té un important paper en la producció d'arginina i en el metabolisme dels aminoàcids dibàsics. La capacitat de conversió renal de citrulina en arginina ha estat ben establerta (Featherston i col., 1973), però aquest

teixit presenta molt baixa activitat carbomoiiltransferasa (Raijman, 1974), enzim que catalitza la conversió d'ornitina a citrul.lina. Per tant, el ronyó per a sintetitzar arginina ha de captar citrul.lina de la circulació. El ronyó ha estat identificat com una font d'arginina per a la síntesi proteica en múscul (Featherston i col., 1973) i, de fet, es considera una de les principals fonts d'arginina de l'organisme, ja que el fetge, malgrat la seva alta taxa de síntesi d'aquest aminoàcid, no n'és un exportador net per la gran activitat arginasa que presenta (Ratner, 1973 entre d'altres). La font de la citrul.lina captada pel ronyó sembla ser l'intestí (Windmueller i Spaeth, 1981).

Hem comentat anteriorment la baixa extracció d'aminoàcids circulants per part del ronyó (0.4-0.8%) en situacions postabsortives i de dejuni (Owen i Robinson, 1963; Felig i col., 1969; Tizianello i col., 1980). En situacions d'acidosi metabòlica, però, aquesta extracció pot arribar a éser del 52% dels aminoàcids arterials (Owen i Robinson, 1963; Heitmann i Bergman, 1980; Schrock i col., 1980; Brosnan i col., 1983 entre d'altres), però tot aquest increment es deu a l'extracció de glutamina. Es ben conegut que el ronyó regenera bicarbonat principalment a través de la seva capacitat d'excretar amoni (Atkinson i Camien, 1982). En moltes condicions fisiològiques aquest amoni es genera en el ronyó mateix mitjançant la desaminació de la glutamina (Atkinson i Camien, 1982; Halperin i Jungas, 1983). L'excreció d'amoni format d'aquesta manera a la orina impedeix que els nitrogens de la glutamina siguin transportats al fetge i convertits en urea, procés aquest que consum bicarbonat (Atkinson i Camien, 1982). La glutamina produeix NH_3 mitjançant una desamidació dins la mitocòndria catalitzada per una glutaminasa dependent de fosfat, i el glutamat així format és oxidat mitjançant la glutamat deshidrogenasa (Nissim i col., 1985). La conversió

final de l' α -cetoglutarat a un compost neutre -glucosa en la rata (Manillier i col., 1985) i CO_2 en gos (Vinay i col., 1980)- en el ronyó generarà 2 ions bicarbonat (ó consumirà dos protons). L'efecte net d'aquests dos processos -el metabolisme intrarrenal de l'esquelet carbonat de la glutamina i l'excreció d'amoni a la orina- és la generació de ions bicarbonat a la circulació ó, el que és el mateix, l'extracció de protons de la circulació (Vinay i col., 1986). Contràriament, quan la glutamina és catabolitzada en el fetge a glucosa ó a CO_2 no hi ha cap generació neta d'amoni ni d'ions bicarbonat, ja que l'amoni alliberat es converteix ràpidament a urea més 1 protó (Atkinson i Camien, 1982; Vinay i col., 1986). Sembla ésser que el turnover d'ATP en el tub proximal del ronyó limita la capacitat màxima de la oxidació de la glutamina i per tant de l'excreció d'amoni (Vinay i col., 1986).

I.1.5. Cervell

La contribució del cervell a la homeostasi dels aminoàcids es considera negligible. No obstant, aquest òrgan utilitza el 25% del total de l'energia produïda per l'organisme adult en estat basal i un 50% en infants (Cahill i col., 1981).

El cervell capta, però, selectivament nutrients de la circulació. Aquesta selectivitat es deu a l'existència de la barrera hematoencefàlica i a la presència de diferents sistemes de transport en ella (Pardridge, 1983). S'han descrit diferents sistemes de transport per hexoses, aminoàcids i altres compostos (Olendorf, 1971; Pardridge i Olendorf, 1977). Per aminoàcids s'ha comprovat l'existència de 3 sistemes de transport, sense que s'hagi observat cap cas en que un aminoàcid pugui ser transportat per més d'un sistema. S'ha descrit un sistema per aminoàcids neutres:

fenilalanina, leucina, tirosina, isoleucina, metionina, triptofan, valina, DOPA, cisteïna, histidina, treonina, glutamina, asparagina i serina. Un sistema per aminoàcids bàsics: arginina, ornitina, lisina. I un sistema per aminoàcids àcids: glutamat i aspartat. Per altra banda, la prolina, alanina i glicina no semblen ser transportats per cap sistema (cinètiques no saturables) (Olendorf i Szabo, 1976).

El fet de que els aminoàcids neutres competeixin per un sistema de transport comú és el responsable de que la captació d'aquests aminoàcids sigui dependent de la seva concentració relativa a la dels altres en la circulació.

Ja hem comentat anteriorment que en casos de malfuncionament hepàtic s'esdevenen encefalopaties degut a l'increment en la concentració circulant d'aminoàcids aromàtics (fenilalanina, tirosina i triptofan), precursors d'amines meuroactives, i una disminució d'aminoàcids ramificats (Munro i col., 1975; Fischer i col., 1976). Per altra banda, s'ha descrit un increment en la captació "in vivo" d'aminoàcids ramificats pel cervell en diabetis (Brosnan i col., 1983, 1984) i en la concentració d'aquests aminoàcids en el cervell de rates diabètiques (Brosnan i col., 1983). S'ha demostrat, també, la presència d'activitat transaminàsica dels aminoàcids ramificats i de la deshidrogenasa dels cetoàcids resultants (Brosnan i col., 1985). Per tant, el cervell podria utilitzar aquests aminoàcids com a font energètica (Chaplin i col., 1976).

El cervell utilitza aminoàcids com a reserva energètica, havent-se comprovat que la glucosa que capta aquest òrgan és convertida a glutamat, glutamina, aspartat i GABA, aminoàcids que estan en equilibri amb intermediaris del cicle de Krebs. Aquesta reserva seria emprada quan la

concentració de glucosa sigui baixa (Davidson, 1976; Wong i Tyce, 1983).

I.2. SÓN ELS ERITRÒCITS UNA VIA DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS ?.

La possibilitat de que els eritròcits siguin una via de transport interòrgans d'aminoàcids és, encara avui, polèmica malgrat les evidències existents per a aquesta hipòtesi. Creiem que una de les causes de la dificultat que hi ha d'acceptar-ho és la possibilitat, sempre present, de l'artefactualitat dels resultats.

Els treballs que aborden aquest problema solen estudiar la diferència en la concentració intraeritrocitària d'aminoàcids en passar per un òrgan o teixit (per diferències arteriovenoses de concentracions). Ara bé, la determinació de la concentració d'aminoàcids intraeritrocitaris presenta problemes metodològics importants. S'ha comprovat que la mesura de la concentració d'aminoàcids en eritròcits aïllats pot ser molt variable segons el procés d'aïllament i rentat emprat. Hagenfeldt i Arvidson (1980) han mostrat que hi ha una pèrdua important d'aminoàcids (especialment essencials) com metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina, quan les cèl.lules s'aïllen i es renten, comparant-ho amb la concentració obtinguda d'una forma més indirecta com és a partir de les dades de concentració en sang i en plasma amb la pertinent correcció per l'hematòcrit. A més a més, s'ha comprovat que també es troben diferències en la concentració eritrocitària d'aminoàcids segons el procés emprat en l'hemòlisi de les cèl.lules (Wolfson i Asplund, 1976). Per tant, la mesura directa de la concentració d'aminoàcids dins les cèl.lules és poc definitiva i està sotmesa a fortes variacions, d'ací que el mètode més emprat sigui l'indirecte a partir de les dades d'aminoàcids en sang total, en plasma i el valor hematòcrit. Si a tot això, es suma el grau d'error existent, malgrat els avenços tècnics, gens

menyspreable, en la mesura d'aminoàcids, es pot entendre la gran variació de resultats, i de conclusions extremes d'ells, que s'han publicat sobre el paper que els eritròcits puguin tenir en el flux d'aminoàcids entre els òrgans.

Un altre factor, que al nostre entendre ha dificultat l'acceptació de la possibilitat de l'existència d'una via eritrocitària de transport d'aminoàcids, ha estat la repetida troballa del lentíssim intercanvi d'aminoàcids que hi ha entre els eritròcits i medi d'incubació (ó plasma com a tal) quan s'ha estudiat "in vitro", sobretot per part d'aquells aminoàcids que amb més rapidesa ho fan "in vivo". Aquesta contradicció ha fet necessària l'especulació de diferents (i tal vegada estranys) mecanismes mai demostrats (i sovint amb enormes dificultats metodològiques per arribar a ser-ho) per a intentar compaginar les dades trobades "in vivo" i "in vitro", que han topat amb una certa incredulitat dins del món científic (per exemple Christensen, 1982).

Actualment, podriem dir que en general, i vistes les evidències existents, s'accepta que els eritròcits puguin contribuir al flux total d'aminoàcids entre els òrgans, però no gaire el que puguin ésser una via independent a la plasmàtica, és a dir, que els eritròcits podrien transportar aminoàcids però en el mateix sentit que el plasma. Així doncs, el coneixement d'aquesta contribució eritrocitària no variaria els conceptes actuals sobre els fluxos d'aminoàcids entre els òrgans, si bé, la manca d'aquest coneixement pot subestimar aquests fluxos... I es continua desconeixent totalment els motius de la manca d'acord entre els estudis "in vivo" i "in vitro".

Les primeres sospites de que els eritròcits podrien intervenir en el procés de transport d'aminoàcids entre els diferents òrgans provenen de la constatació de la presència

d'aminoàcids lliures dins dels glòbuls rojos, en unes concentracions relativament altes, i amb la mateixa constància que altres "pools" d'aminoàcids lliures de la resta de l'organisme: des del plasmàtic als diferents "pools" tissulars. McNenamy i col. (1960) fan un dels primers tocs d'atenció a la possibilitat de que els eritròcits puguin tenir un paper més actiu del que fins llavors (i en alguns casos també ara) se'ls hi otorgava: "Per a entendre el paper de la sang en el metabolisme i transport d'aminoàcids és necessari saber no tan sols la concentració plasmàtica d'aquests compostos i el seu recanvi, sinó conèixer també llur distribució entre el plasma i els elements sanguinis". A aquesta conclusió hi arribaren en estudiar en humans la concentració eritrocitària d'aminoàcids i, en correlacionar-la amb la plasmàtica, observaren que la concentració d'alanina, glutamina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina, isoleucina, leucina i urea no era significativament diferent entre els dos compartiments sanguinis, mentre que si ho eren les d'arginina, glutamat, histidina, ornitina, serina, glicina i aspartat. Per altra banda, observaren que existia una correlació linial positiva entre les concentracions plasmàtiques i eritrocitàries d'alanina, prolina, tirosina, valina, leucina, isoleucina i urea, la qual cosa els permetia pensar que aquests darrers aminoàcids i la urea presentaven una distribució controlada per processos de difusió.

Aquestes dades, òbviament, no permeten extreure conclusions sobre si realment es pot otorgar als eritròcits un paper actiu en el transport interòrgans d'aminoàcids. Per esbrinar aquest paper dels eritòcits és necessari realitzar estudis més dinàmics de moviments d'aminoàcids en la fracció corpuscular de la sang en passar a través dels diferents òrgans i teixits.

Les primeres evidències de que "in vivo" els eritròcits podien jugar un paper actiu en el transport d'aminoàcids les debem a Elwyn i col.laboradors, els quals, en una serie de treballs (Elwyn, 1966; Elwyn i col., 1968, 1972), estudiaren els moviments dels aminoàcids en plasma i eritròcits durant el pas de la sang pels teixits del llit esplàncnic de gossos, mitjançant la col.locació de catèters crònics en la vena porta, la vena hepàtica i l'artèria aorta i l'extracció de sang a intervals regulars durant períodes de 24 hores. Observaren que hi havia canvis en la concentració plasmàtica d'aminoàcids en la vena porta relacionats amb la ingesta. També comprovaren que variava la concentració d'aminoàcids en els eritròcits, i aquests canvis semblaven independents del ritme d'ingesta i per tant dels plasmàtics. Quan estudiaren la distribució dels aminoàcids entre el plasma i els eritròcits comprovaren que aquesta distribució variava en passar la sang a través del llit esplàncnic, trobant que la concentració eritrocitària era més baixa en la vena porta que en l'artèria aorta, però era més alta en la vena hepàtica que en la vena porta i que en l'artèria. Això era especialment cert pels aminoàcids gluconeogenètics alanina, serina, aspartat i glutamat, pels aminoàcids aromàtics tirosina i fenilalanina, i pels bàsics arginina, histidina i lisina. Aquestes dades, junt amb altres de càlculs d'activitats específiques després de l'administració de traçadors radioactius, els portaren a concloure l'existència d'un transport via eritròcits independent del plasmàtic, de forma que els eritròcits serien els responsables del transport d'aminoàcids del fetge als teixits perifèrics, mentre que el plasma transportaria els aminoàcids en recorregut invers, és a dir entre l'intestí i els teixits perifèrics al fetge.

El fet de donar-li un paper actiu als eritròcits en el transport d'aminoàcids "in vivo" xoca d'entrada amb les

dades obtingudes "in vitro" del pas d'aminoàcids a dins dels eritròcits, els quals mostren un temps d'equilibració d'hores en humans pels aminoàcids neutres de cadena curta (alanina, serina, glicina per exemple) i de pocs minuts pels aminoàcids neutres de cadena ramificada, mentre que apenes es detecta pas pels aminoàcids àcids (glutamat i aspartat) (Winter i Christensen, 1964; Young i col., 1980, 1983 entre d'altres).

Estudiant la relació entre la concentració en eritròcits i plasma, s'observa que precisament glutamat i aspartat són dels aminoàcids que presenten uns valors més alts d'aquesta relació (E/P): en gos 4.1 pel glutamat i 9.9 per l'aspartat (Elwyn, 1966), en humans 11.3 pel glutamat i 48.9 per l'aspartat (Hagenfeldt i Arvidson, 1980), mentre que els aminoàcids que més fàcilment s'equilibren "in vitro" són els que presenten "in vivo" una relació E/P més propera a 1 (especialment leucina, valina i isoleucina).

En vista dels resultats del transport "in vitro" pot sorprendre que els aminoàcids més lents a equilibrar-se siguin els que "in vivo" estan més concentrats a dins dels eritròcits. Per Christensen (1982) l'explicació podria raure en l'origen d'aquests aminoàcids, suggerint que el glutamat provindria d'un precursor que passés, ell sí, amb més facilitat la membrana de l'eritròcit. També es podria pensar que el que aquests aminoàcids estiguin més concentrats a dins els eritròcits pot ser una conseqüència del procés de maduració d'aquestes cèl.lules. En madurar de reticulòcits a eritròcits hi ha una activa proteòlisi, i per tant una gran quantitat d'aminoàcids lliures. Aquells que siguin permeables a la membrana sortiran ràpidament de la cèl.lula, mantenint una concentració similar a la del medi. Però aquells més impermeables romandran dins la cèl.lula, augmentant llur concentració. Elwyn i col.(1972), però, amb

l'administració d'aminoàcids radioactius i estudiant els canvis d'activitats específiques en atrevessar els eritròcits diferents òrgans, observen que les taxes de canvi en les concentracions de serina i glicina en eritròcits són unes 20 vegades més altes que les trobades "in vitro". Aquestes dades, junt amb les evidències del paper "in vivo" que hem comentat anteriorment, els porta a raonar que aquests moviments d'aminoàcids són molt difícils d'explicar basant-se només amb intercanvis d'aminoàcids entre eritròcits i plasma, ja que hi ha grans canvis en la concentració i en l'activitat específica en atravessar la sang llits sinusoidals ó capilars, procés que dura pocs segons (2-10 segons).

Aquestes velocitats de canvi poden ser en alguns casos unes 100 vegades més altes que les trobades "in vitro". Per tant hi hauria d'haver uns rapidíssims augments i disminucions en les taxes de transport d'aminoàcids a través de la membrana eritrocitària en entrar ó sortir la sang dels llits capilars, ó bé també es podria explicar per canvis importantíssims en les taxes de producció i degradació intraeritrocitària dels diferents aminoàcids. Tant una com l'altra semblen hipòtesi ben inversemblants. El que Elwyn i col.laboradors postularen és que els glòbuls rojos intercanviaven aminoàcids directament amb les cèl.lules tissulars, les quals podrien ser diferents de les cèl.lules que interactuessin amb el plasma, ó essent les mateixes, els "micropools" intracel.lulars d'aminoàcids accessibles als dos compartiments sanguinis fossin diferents. D'aquesta forma es podria explicar un paper actiu pels eritròcits i, a més a més, independent del plasmàtic.

Aquesta hipòtesi, però, no explica el fet de que l'eritròcit "in vivo" en molt pocs segons pugui carregar-se ó descarregar-se d'aminoàcids, procés que "in vitro" és



lentíssim. A més a més, la hipòtesi d'Elwyn implica que hi hagi un contacte físic entre les membranes de l'eritròcit i les de la cèl.lula tissular. La possibilitat de que hi hagi realment un contacte d'aquest tipus és generalment acceptada donat el diàmetre d'alguns capilars i dels eritròcits, i fins i tot s'han publicat observacions microscòpiques d'aquest contacte (per exemple Branemark, 1965). En una recent revisió de la morfologia i composició de la membrana de l'eritròcit (Vittala i Jarnefelt, 1985) es comprova, però, que la membrana de l'eritròcit presenta moltes irregularitats, podent arribar algunes a 500 Å de gruix, que, segons els mateixos autors, podrien protegir a l'eritròcit de les pressions a que està sotmès en el seu pas a través dels intersticis dels capilars. Aquestes irregularitats, junt amb la capa de carbohidrats que cobreix la membrana (aproximadament 150 Å de gruix) i la capa d'aigua associada, impossibilita, de fet, el contacte real entre les membranes (Vittala i Jarnefelt, 1985).

Existeix una altra explicació de la contradicció "in vivo"- "in vitro" que, malgrat que no sigui massa considerada a la bibliografia, s'ha de tenir en compte. Es una ampliació d'una idea original d'Elwyn (1968), que hem comentat una mica més amunt, i que fa referència a possibles canvis en les taxes de transport d'aminoàcids a través de la membrana eritrocitària en passar els eritròcits per diferents òrgans i teixits. Aquests canvis podrien venir donats per l'acció de certes substàncies, secretades o inactivades pels diferents teixits, que alteressin el transport a través de la membrana eritrocitària. Aquestes substàncies haurien de romandre enganxades en els teixits originals, ja que els canvis de concentració d'aminoàcids dins dels eritròcits no es donen d'aquesta forma tan ràpida en els vasos sanguinis entre òrgans. En aquest sentit Sadasivudu i Valli (1980) en un curiós i molt preliminar

experiment observen que quan s'incuben eritròcits amb homogenats de diferents teixits de rata hi ha una pèrdua d'alanina i citrul.lina (únics aminoàcids que estudien) diferent segons l'homogenat sigui d'un ó altre teixit: l'homogenat de múscul produeix la màxima sortida de citrul.lina i l'homogenat de ronyó la màxima sortida d'alanina. Aquestes dades donen peu a especular amb la possibilitat de l'existència de factors específics que expliquin aquest comportament diferencial.

La hipòtesi d'Elwyn, que otorga als eritròcits una funció tan clara en el transport dels aminoàcids del fetge als teixits perifèrics, no ha estat corroborada per altres estudis realitzats en diferents espècies. Estudis que, per altra banda, coincideixen en demostrar que hi ha transport d'aminoàcids entre els òrgans via els eritròcits, si bé, en general, té el mateix sentit que el plasmàtic. Creiem convenient remarcar que tots els estudis realitzats "in vivo" evidencien l'existència d'una via eritrocitària de transport interòrgans d'aminoàcids.

Aoki i col. (1972), estudiant l'efecte de la insulina sobre la captació de glutamat pel múscul en humans, trobaren que només s'observava un efecte estimulants de la insulina sobre la captació de glutamat quan s'estudiava la diferència arteriovenosa de sang total, però no quan s'estudiava el plasma, indicant això que els eritròcits eren els determinants d'aquesta captació. Per a explicar-ho hipotetitzaren un moviment de glutamat del plasma als eritròcits en passar pel llit vascular del múscul. La insulina actuaria, segons aquests autors, canviant el sentit del flux, anant de les cèl.lules al teixit (segons ells via plasma). Argumentaren, a més a més, que les discrepàncies amb els treballs "in vitro" sobre la velocitat del transport de glutamat a través de la membrana eritrocitària, estarien

en la utilització de plasma i cèl.lules, en aquests treballs "in vitro", que estiguessin equilibrats respecte el glutamat.

Arrel de les dades d'Elwyn en gos i d'Aoki en humans, Felig i col. (1973) realitzaren en humans un estudi més sistemàtic per a comprovar si els eritròcits estaven involucrats en el flux interòrgans d'aminoàcids. Empraren humans en estat postabsortiu (10-14 hores de dejuni) i estudiaren el bescanvi d'aminoàcids entre el llit esplàncnic i els teixits perifèrics, analitzant les diferències arteriovenoses de concentracions dels diferents aminoàcids en sang i plasma. Veieren que hi havia una sortida significativa d'aminoàcids dels teixits perifèrics via eritròcits per glutamina, alanina, isoleucina, leucina i tirosina (si bé, la tendència a la sortida es pot observar per a tots els aminoàcids). També, però, hi havia sortida significativa via plasma, i, per tant, el sentit del transport via eritròcits era el mateix que via plasma. El mateix tipus de resultat obtingueren en estudiar el llit esplàncnic, i l'intestí en concret. Només existia un cas en que el transport via eritròcits fos en sentit invers al transport per plasma: l'intestí captava glutamina del plasma però n'alliberava als eritròcits. D'aquests resultats concluderem que el transport d'aminoàcids entre els òrgans no es podia explicar només en base a un transport via plasma, però la contribució dels eritròcits era quantitativa i no qualitativa (amb l'excepció de la glutamina en l'intestí) i depenia de l'aminoàcid, essent pel cas de l'alanina d'un 22-32% del flux total d'aquest aminoàcid del múscul i intestí al fetge.

Conclusions similars a aquesta s'han extret estudiant el flux interòrgans d'aminoàcids en bous (Heitmann i Bergman, 1980), on els eritròcits tindrien un paper

quantitatiu inferior que en humans donat que és més baix l'hematòcrit, i també en vedells alimentats i dejunats (McCormick i Webb, 1982).

S'ha descrit que la contribució dels eritròcits en el transport d'aminoàcids al múscul varia en funció del temps després d'una ingesta proteica per part d'humans dejunats. La ingesta proteica resulta en una concentració incrementada de treonina, prolina, citrulina, valina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, ornitina, glicina, alanina i lisina en els eritròcits en l'artèria (Aoki i col., 1973), senyal de que els eritròcits podrien estar implicats en el flux d'aminoàcids cap el múscul, que, recordem-ho era el que proposava Elwyn. En aquesta situació d'ingesta proteica és la fracció plasmàtica la més important, quantitativament parlant, en la deposició d'aminoàcids en el múscul, però hi ha un període de temps (2-3 hores després de la ingesta proteica) en que la contribució dels eritròcits arriba a igualar, o inclòs a superar, a la plasmàtica (Aoki i col., 1973). En un altre estudi s'ha vist que després d'una ingesta rica en proteïnes, en humans, els nivells de glutamat intraeritrocitaris disminueixen (més baixos com més alt sigui el contingut proteic de la dieta) (Maher i col., 1984), la qual cosa fa pensar en un possible efecte de la insulina, secretada com a resposta a la ingesta proteica, sobre la captació de glutamat dels eritròcits pel múscul, com havien descrit Aoki i col. (1973).

Com es pot observar, existeix una gran variabilitat quant a la importància del transport d'aminoàcids via eritròcits tant pel que respecta a diferències específiques com a comportaments molt diferents d'uns aminoàcids respecte d'altres i a variacions d'aquest paper dels eritròcits d'un teixit a un altre. Un exemple d'aquesta variabilitat específica és la captació de glutamina pel ronyó en animals

acidòtics crònics: s'ha descrit que no existeix transport via els eritròcits en el gos (Vinay i col., 1985), però en rata ha estat descrita tant una contribució dels eritròcits (Vinay i col., 1985) com la no existència de contribució (Squires i col., 1976).

Per altra banda, la contribució dels eritròcits al flux interòrgans d'aminoàcids pot variar en funció de l'estat fisiològic. Estudis de compartimentació sanguïnia d'aminoàcids en la rata han mostrat que existeixen canvis significatius en la concentració eritrocitària d'aminoàcids en relació a la plasmàtica en funció de l'edat (López-Tejero i col., 1985) així com durant la gestació i l'alletament (López-Tejero i col., 1986).

I.3. TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN ERITRÒCITS I RETICULÒCITS "IN VITRO".

Els eritròcits han estat, i són, un dels models més emprats per a l'estudi dels processos de transport d'aminoàcids. La seva facilitat d'obtenció, i per tant la possibilitat d'obtenir suspensions molt pures d'aquestes cèl.lules comparant-ho amb la dificultat que sovint existeix d'obtenir poblacions pures d'altres tipus cel.lulars, així com el fet del baixíssim metabolisme d'aminoàcids que presenten aquestes cèl.lules, la qual cosa facilita l'estudi del transport en no haver-hi interferències entre metabolisme i transport, i per tant no ser necessari l'ús d'inhibidors, i també, per altra banda, la no existència de síntesi de proteïnes en els eritròcits de mamífers, són algunes de les raons que van fer dels eritròcits un model molt vàlid per aquests tipus d'estudis. Existeixen també altres avantatges que s'han de tenir en compte, i que són avantatges més especialitzats. S'ha anat comprovant a mesura que s'ha anat extenent el seu estudi que els sistemes de transport descrits en aquestes cèl.lules són més específics per grups d'aminoàcids concrets que no pas en altres tipus cel.lulars com les cèl.lules d'Ehrlich ó hepatòcits per exemple. Aquesta major concreció dels aminoàcid transportats per un sistema de transport determinat facilita enormement la seva descripció. Un altre avantatge és que la possibilitat d'estudiar els sistemes de transport d'aminoàcids en una línia cel.lular que presenta importants canvis morfològics i funcionals, com seria la maduració dels eritroblasts fins a eritròcits passant per l'estat de reticulòcits, permet un estudi de tipus evolutiu de canvis en aquests sistemes i per tant permet incidir en gran manera sobre els mecanismes del transport.

El fet d'existir tots aquests avantatges en l'ús dels

eritròcits per a l'estudi dels sistemes de transport ha implicat també que no s'hagi incidit en aspectes més funcionals, fisiològicament parlant, i siguin els eritròcits de fet, una eina mecanicista d'estudis quasi fisico-químics. A aquesta realitat ha contribuït sens dubte el fet que les velocitats del transport de molts aminoàcids en eritròcits madurs són massa lentes per a que s'hagi considerat que aquests sistemes de transport tinguin alguna funció fisiològica important, i s'acostumen a considerar com a simples productes en procés de degeneració provinents de cèl.lules antecessores on si que tindrien un clar paper funcional.

Dins d'aquest context de l'extens ús dels eritròcits per a estudis sobre el transport d'aminoàcids i de les diferències en les diferents espècies estudiades de la presència de diferents sistemes de transport, no deixa de ser curiós que els eritròcits de rata hagin estat oblidats, més encara si es pensa en l'ampla utilització d'aquest animal com a model de laboratori per molts altres aspectes de la investigació.

En aquesta introducció intentarem donar una visió general sobre els coneixements actuals del transport d'aminoàcids en eritròcits i reticulòcits, fent incidència també en l'evolució d'aquests coneixements i dels conceptes que d'ells s'han extret.

I.3.1. Transport d'aminoàcids neutres.

El grup dels aminoàcids neutres és un conjunt d'aminoàcids heterogeni que són transportats, en general, per diferents sistemes de transport. Els primers treballs realitzats en eritròcits humans estaven enfocats a intentar estudiar la relació entre l'estructura dels aminoàcids i la

seva més o menys facilitat per a ser captats en un intent d'extreure conclusions sobre la natura del transport. Aquests estudis demostraren que hi havia de fet tres tipus de transport prou diferents: Un tipus de transport emprat per la majoria d'aminoàcids neutres, però preferit pels aminoàcids de cadena llarga, saturable i que presentava el fenomen del contratransport. El segon tipus de transport semblava molt específic per alanina i glicina, i era saturable i de molt baixa capacitat. Un tercer tipus de transport semblava no saturable i més aviat limitat a aminoàcids de cadena llarga. (Winter i Christensen, 1964).

Per aquesta mateixa època, s'observà el fet que els eritròcits de colom - que són nucleats- tenien una més gran capacitat d'acumular glicina que els eritròcits humans. A més, aquesta capacitat acumulativa es comprovà que era totalment dependent de la presència de sodi en el medi, la qual cosa confirmava el requeriment d'aquest catió en els processos de transport de certs compostos com el transport de sucres per la mucosa intestinal (Riklis i Quastel, 1958; Csaky i Thale, 1960), el transport de certs aminoàcids també per la mucosa intestinal (Csaky, 1961), en leucòcits humans (Yunis i col., 1963) i en les cèl.lules tumorals d'Ehrlich (Christensen i col., 1952). En una sèrie de treballs, Vidaver definí els trets principals del transport de glicina en eritròcits de colom (Vidaver, 1964a,b,c). Observà que, com hem comentat anteriorment, la capacitat d'acumul d'aquest aminoàcid era dependent de la presència de sodi en el medi i establí que no era només la sola presència d'aquest catió el determinant de la capacitat d'acumular glicina sinó que el que importava era l'existència d'un gradient de concentració a dins i a fora la cèl.lula del sodi, de forma que treballant amb eritròcits hemolitzats i reestablerts, controlant així la composició intracel.lular, observà que canviant el gradient de sodi la cèl.lula s'omplia o es

buidava de glicina seguint el sentit d'aquest gradient. Una altra troballa important fou que l'esteioquimetria del transport de glicina implicava 2Na^+ i que de fet es tractava d'un transport electrogènic i per tant dependent del gradient elèctric generat pel gradient de concentració de sodi. Amb estudis d'inhibicions, aquest mateix autor (Vidaver i col., 1964) comprovà que aquest transport de glicina era molt específic ja que només observava inhibició del transport de glicina quan hi havia en el medi suficient concentració d'etil- i de metil-glicina (sarcosina). També observà l'existència d'un transport d'alta capacitat per l'alanina però no era inhibible per la glicina, deduint que eren rutes d'entrada diferents.

A partir d'aquestes dades Winter i Christensen (1965) compararen el transport d'aminoàcids neutres en reticulòcits i eritròcits de conill. La seva idea era comprovar si els reticulòcits es podien equiparar als eritròcits de colom en les seves propietats de transport donat que ambdues cèl.lules són nucleades i tenen metabòlicament moltes semblances. De ser cert, permetria obtenir un model per a estudiar els mecanismes implicats en la pèrdua de la capacitat d'acumular certs aminoàcids en madurar aquestes cèl.lules a eritròcits. Els resultats mostraren que durant el procés de maduració es perdien les característiques de transport altament afí per l'alanina i per la glicina mentre que el transport dels aminoàcids de cadena més llarga no variava de forma significativa. De fet, descrigueren en els reticulòcits tres grans tipus de transport: Un per aminoàcids neutres de cadena llarga no dependent de sodi, amb capacitat de bescanvi i que no transporta contra gradient. Un altre afí per l'alanina amb dependència de sodi i que presentava capacitat de contratransport o de bescanvi, i que presenta la capacitat de transportar contra gradient. I un tercer molt específic per la glicina dependent de sodi

que també transportava contra gradient. La maduració a eritròcit implicava la pèrdua de dependència al sodi i la capacitat concentrativa per l'alanina i per la glicina. Treballs posteriors de Wheeler i Christensen (1967a,b) i Eavenson i Christensen (1967) en eritròcits de colom i reticulòcits de conill, confirmaren les troballes anteriors i establiren que la capacitat d'acumul de glicina i alanina es podia explicar per bescanvi amb altres aminoàcids de l'interior de la cèl.lula i que aquest procés de bescanvi era dependent de sodi. De fet les darreres descripcions de sistemes de transport en eritròcits de colom implicaven ja 4 sistemes diferents: un sistema independent de sodi, sense capacitat de trans-estimulació (bescanvi) per aminoàcids de cadena llarga, anomenat sistema LP per analogia amb el sistema L descrit en les cèl.lules d'Ehrlich.. Un altre sistema dependent de sodi, que funcionava per bescanvi per alanina, serina, cisteïna, prolina i probablement per treonina i aminoàcids similars. Aquest sistema s'anomenà ASCP per la seva similitud amb el sistema ASC de les cèl.lules d'Ehrlich (amb l'excepció de la capacitat de bescanvi). El tercer sistema era dependent de sodi i molt específic per glicina i sarcosina com ja havia descrit Vidaver. El quart era un sistema que transportava β -alanina i taurina però no α -aminoàcids. Com es pot observar els sistemes descrits en eritròcits de colom anaven resultant cada cop més similars als sistemes descrits en altres tipus cel.lulars. La principal diferència estava en les capacitats de bescanvi ó de trans-estimulació. El que el sistema dependent de sodi ASCP fos un sistema de bescanvi, mentre que l'independent de sodi no presentés trans-estimulació contradeïa la generalització que associa la dependència al sodi amb transport net i la independència amb transport per bescanvi. No obstant, la capacitat de bescanvi es comprovà que no era una propietat essencial d'un sistema de transport determinat en trobar que per tractament químic es podia

suprimir la capacitat de bescanvi del sistema L en les cèl.lules d'Ehrlich sense alteracions en les altres propietats d'aquest sistema (Oxender i Whitmore, 1966).

Resumint el que es coneixia aleshores es podria dir que les cèl.lules més immadures com els reticulòcits de mamífers i els eritròcits de colom presentaven sistemes dependents de sodi per alanina i glicina, mentre que les cèl.lules més madures, com els eritròcits de mamífers, perdien aquests sistemes dependents de sodi. Això també s'aplicà a la rata com uns anys més tard publicà Wise (1975) en una de les comptadíssimes referències a aquest animal, però sense realitzar estudis minimament complets de les cinètiques del transport.

Els intents d'establir els motius de la pèrdua de sistemes de transport en madurar les cèl.lules han anat fracasant en no poder demostrar cap lligam entre processos diferencials que hi ha entre reticulòcits i eritròcits i els sistemes de transport. Es pensà que si una de les diferències més patents és la pèrdua de la capacitat de síntesis de proteïnes en madurar la cèl.lula, aquesta podria ésser la causa de la pèrdua de sistemes de transport. Es realitzaren experiments amb inhibidors de la síntesi de proteïnes en reticulòcits i no s'observà cap efecte en el transport d'aminoàcids (Yunis i Arimura, 1964). També s'intentà relacionar la pèrdua de sistemes de transport dependents de sodi amb una més baixa activitat de la bomba de sodi ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$) que hi ha en els eritròcits respecte els reticulòcits, però la inhibició que es produïa d'aquesta activitat amb ouabaina no afectava el transport dependent de sodi (Wheeler i Christensen, 1967a). Succeí el mateix en l'intent d'establir com a responsable d'aquests canvis a la pèrdua de la capacitat respiratòria dels eritròcits madurs, emprant cianur i altres inhibidors (Wheeler i Christensen,

1967a,b), així com tampoc es trobà relació entre els nivells d'ATP intracel.lular i el transport dependent de sodi (Vidaver, 1964a; Benderoff i col., 1978).

El grup de Young ha estat dels pocs que ha intentat establir una relació entre transport d'aminoàcids "in vitro" i funcionalitat cel.lular. Observaren que hi havia una línia genètica de bens que presentaven una concentració molt baixa de glutatió dins dels eritròcits i altes concentracions d'alguns aminoàcids, sobretot de lisina i ornitina, intraeritrocitaris. Comprovaren que aquestes alteracions eren degudes a un defecte en el transport d'aminoàcids i establiren que els eritròcits amb baixos nivells de glutatió no presentaven un sistema de transport que si presentaven els eritròcits normals. El sistema de transport que mancava resultà ser un nou sistema de transport no descrit fins llavors. Es tractava d'un sistema amb unes característiques molt similars a les descrites pel sistema ASC, però a diferència d'aquest no presentava dependència de sodi. Com que era un sistema amb una alta afinitat per la cisteïna, l'anomenaren sistema C (Young i col., 1976; Young i Ellory, 1977). Aquests autors hipotetitzaren que el sistema C seria una variant del sistema ASC, el qual hagués perdut la dependència al sodi.

En anys subsequents, s'ha anat definint de forma cada cop més precisa els transport d'aminoàcids en eritròcits fent anàlisis cinètiques molt detallades per exemple del transport de leucina en eritròcits humans (Rosenberg, 1981) i d'altres aminoàcids en eritròcits humans i de be (Young i col., 1980). Les troballes més significatives segurament han estat el fet de demostrar l'existència de transport dependent de sodi en eritròcits madurs humans. Estudis més detallats del transport de glicina establiren que en eritròcits madurs humans existeix un transport molt afí per

glicina i sarcosina, amb dependència de sodi. Aquest sistema semblava el mateix que el descrit en eritròcits de colom i en reticulòcits de conill i humans i s'ha anomenat sistema Gly (Ellory i col., 1981; Rosenberg, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982). A diferència del que succeix en humans, s'ha comprovat que els eritròcits madurs de cobaia no el presenten, però si els reticulòcits (Fincham i Col., 1984). També s'ha demostrat la presència del sistema ASC en eritròcits madurs humans, i junt amb aquesta descripció s'ha confirmat la no presència del sistema A descrit en altres tipus cel·lulars (Le CAM i Freychet, 1977) en observar la manca d'inhibició per metil-AIB del transport d'alanina (Rosenberg, 1982, Al-Saleh i Wheeler, 1982, Young i col., 1983). Aquests fets indiquen que existeix una gran variabilitat quant la presència de sistemes de transport en les diferents espècies, i que les conclusions que s'havien extret en treballs més antics en el sentit que en madurar la cèl·lula es perdien els sistemes de transport dependents de sodi mereix una revisió.

Un altre descobriment interessant ha estat el comprovar que en realitat existien dos tipus de sistemes de transport independents de sodi: un és el clàssic sistema L, l'altre transporta de forma específica el triptofan i s'ha anomenat sistema T (Rosenberg i col., 1980; Rosenberg, 1981). S'ha comprovat que aquest darrer sistema no és present ni en les cèl·lules tumorals d'Ehrlich, ni en enteròcits, i per tant, almenys per ara, sembla específic d'eritròcits humans (Lòpez-Burillo, 1985; Vadgama i Christensen, 1985).

Recentment s'ha descrit en cavalls la presència d'un sistema independent de sodi amb les mateixes característiques del descrit per Young i col.laboradors en el be, i que havien anomenat sistema C i, com en el cas del be, existeixen fenotips també en cavalls on manca aquest

sistema (Fincham i col., 1985; Fincham i Young, 1985). Aquest sistema presenta també la característica de funcionar per intercanvi.

Actualment hi ha un conveni per denominar d'una manera homogènia els sistemes de transport, donada la gran quantitat d'entitats diferents que es van describint. S'ha acceptat que els sistemes dependents de sodi s'anomenin amb lletres majúscules i els independents de sodi en lletres minúscules, deixant però com a excepció els noms molt arraigats com el sistema L ó el T. Tenint en compte aquest conveni hi ha un acord en denominar el sistema C com a sistema asc pe a distingir-lo del sistema ASC dependent de sodi (Vadgama i Chistensen, 1985). Aquest treball que acabem de citar dóna una visió nova a algunes característiques dels sistemes de transport en eritròcits que creiem convenient comentar.

Haviem vist anteriorment que es discutia la possibilitat que un sistema de transport que presentés dependència al sodi pogués perdre aquesta dependència sense alterar-se però les seves altres característiques (per exemple Young i Ellory 1977). Vadgama i Christensen (1985) discuteixen aquesta possibilitat argumentant que la pèrdua del sodi com a cosubstrat hauria de comportar alteracions en la selectivitat dels aminoàcids transportats per aquest sistema i que, per ells, aquests dos sistemes, el dependent i l'independent de sodi serien entitats diferents. La seva hipòtesi ha estat considerar que si eren entitats diferents aleshores s'haurien de trobar aquests dos sistemes junts en alguns tipus cel.lulars menys madurs que els eritròcits de mamífers. Si, per altra banda, el sistema asc era una variant del sistema ASC produïda en processos de maduració, aleshores no es trobarien mai junts en les mateixes cèl.lules. Els resultats que han obtingut demostren que els

dos sistemes coexisteixen en els eritròcits de colom, i que per tant es tracta de dos sistemes independents un de l'altre. Aquests resultats, a més a més, els han fet replantejar l'antiga qüestió del funcionament per intercanvi dels sistemes dependents de sodi que anteriorment havíem comentat. Analitzant altre cop les dades obtingudes els anys 60, arriben a la conclusió que el que succeïa era que hi havia una interferència d'aquests dos sistemes i que la capacitat d'intercanvi que havien vist aleshores es devia al sistema actualment descrit com a asc.

I.3.2. Transport d'aminoàcids bàsics.

En les cèl.lules d'animals superiors els aminoàcids catiónics solen ser transportats per un sistema anomenat Ly^+ ó actualment y^+ , el qual reconeix grups carregats positivament però també poden se transportats per sistemes d'aminoàcids neutres (per a revisió vegeu Guidotti i col., 1978, Christensen, 1984).

Com en el cas dels aminoàcids neutres s'ha vist que existeixen diferències entre el transport d'aminoàcids bàsics en reticulòcits i eritròcits de diferents espècies. Així s'ha comprovat que en reticulòcits de conill els aminoàcids bàsics, lisina i arginina principalment, eren transportats per un sistema similar al sistema Ly^+ descrit en les cèl.lules d'Ehrlich (Christensen i Antonioli, 1969). En madurar aquestes cèl.lules a eritròcit aquest sistema desapareixia i els aminoàcids bàsics eren captats per processos no saturables (Antonioli i Christensen, 1969).

En eritròcits madurs humans s'ha comprovat que aquest sistema perdura i és perfectament funcional, tractant-se d'un sistema no dependent de sodi i no acumulatiu (Young i col., 1980)

En eritròcits de bous aquest sistema no existeix i els aminoàcids bàsics són transportats pel sistema C (ó asc) el qual presenta afinitat per a aquests aminoàcids (Young i col., 1976; Young i Ellory, 1977)

I.3.3. Transport d'aminoàcids àcids.

Els aminoàcids aniònics són pràcticament impermeables a les membranes dels eritròcits ja siguin humans o de bou (Young i col., 1980). Aquests eritròcits presenten una captació quasi nul·la d'aminoàcids aniònics. L'única excepció coneguda fins ara són els eritròcits de gos els quals presenten un sistema de transport altament afí per glutamat i aspartat, dependent de sodi i acumulatiu (Inaba i Maede, 1984). Aquest sistema és similar al que hi ha en el tub proximal del ronyó (Schneider i Sacktor, 1980), en fetge (Sips i col., 1982; Gazzola i col., 1981), en el sistema nerviós central (Logan i Snyder, 1971) i en fibroblasts humans (Dall'Asta i col., 1983) i s'ha designat com sistema X_{AG}^- .

II. OBJECTIUS

Com hem comentat en la introducció d'aquesta memòria existeix una certa polèmica quant a la possibilitat de que els eritròcits puguin constituir una via de transport d'aminoàcids entre els diferents òrgans. Aquesta polèmica va també lligada a les capacitats dels eritròcits per a transportar aminoàcids "in vitro" les quals s'han considerat massa baixes per a explicar els ràpids canvis que un transport interòrgans implica.

El treball que constitueix la present memòria s'ha d'entendre en un context més ampli. El nostre interès inicial estava en l'estudi de la regulació dels diferents fluxos interòrgans en la rata dins d'un context més ampli de continuació de l'estudi del metabolisme nitrogenat. Des d'aquest punt de vista és necessari establir per quines vies es realitza aquest transport i en aquest sentit la bibliografia no ajudava massa en haver-hi conclusions diferents sobre la possible contribució dels eritròcits tant des d'un punt de vista quantitatiu com qualitatiu en les diferents espècies i situacions estudiades. A més a més, i com a més important, no existeixen referències de quina és la situació en la rata.

La primera part d'aquest treball té, doncs, com a objectiu el definir d'una forma relativament exhaustiva si els eritròcits estan implicats ó no en els fluxos d'aminoàcids entre diferents òrgans de la rata. I si tenen una contribució intentar quantificar-la. L'hem titulat Contribució dels eritròcits al transport "in vivo" d'aminoàcids entre els òrgans

En observar l'important paper que tenen els eritròcits en els fluxos d'aminoàcids entre els òrgans de la rata en una situació concreta com la que havíem estudiat, el nostre interès es decantà vers a intentar incidir sobre els

mecanismes implicats en aquest transport "in vivo" tenint en compte les contradiccions que sovintejaven en la bibliografia entre els estudis "in vivo" i "in vitro". Altre cop, ens trobarem que la rata havia estat oblidada en els estudis del transport "in vitro" d'aminoàcids i per tant ens obligava a partir de zero. L'objectiu de la segona part fou caracteritzar el transport d'una sèrie d'aminoàcids representatius per eritròcits "in vitro" i ha estat titulada Transport d'aminoàcids en eritròcits "in vitro"

Un cop descrites les característiques principals del transport de diferents aminoàcids i en observar que existia una relació bastant estranya entre els processos "in vitro" i els resultats obtinguts "in vivo" i conegudes les diferents hipòtesis existents per a explicar el comportament dels eritròcits "in vivo" pensàrem que podríem obtenir algun indici del que estava succeint amb la següent hipòtesi de treball. La bibliografia mostrava que cèl.lules més immadures que els eritròcits com podien ésser els reticulòcits tenien unes capacitats de transport de certs aminoàcids més elevades que els eritròcits. Ens plantejàrem que si els sistemes de transport determinats "in vitro" estaven implicats en els processos de transport observats "in vivo" aleshores potser si "in vivo" hi havia alts nivells de cèl.lules amb més capacitat de transport observariem que la contribució d'aquestes cèl.lules al transport interòrgans d'aminoàcids seria també més important. Per tant, havíem d'emprar rates amb alts nivells de reticulòcits circulants per a estudiar els fluxos interòrgans d'aminoàcids. Prèviament a aquest experiment havíem de demostrar que els reticulòcits de rata tenien aquesta més alta capacitat de transport "in vitro" que la bibliografia demostrava per altres espècies, i aquest fou l'objectiu de la part 3 d'aquesta memòria: determinar les característiques del transport d'alguns aminoàcids

representatius en reticulòcits de rata, part que hem titulat Transport d'aminoàcids en reticulòcits "in vitro".

Un cop demostrat que els reticulòcits de rata presenten per alguns aminoàcids una capacitat de transport més elevada que els eritròcits estàvem en condicions de realitzar l'estudi de la possible contribució d'aquestes cèl.lules al transport d'aminoàcids "in vivo", la qual cosa constituí l'objectiu de la part 4 d'aquesta memòria, que hem titulat Contribució dels reticulòcits al transport "in vivo" d'aminoàcids entre els òrgans, tenint molt present que no es tractava pas de comparar d'una forma quantitativa per cada aminoàcid la contribució dels eritròcits i dels reticulòcits sinó que la comparació havia d'ésser molt més general.

III. MATERIALS I METODEDES

III.1. PART 1: CONTRIBUTIÓ DELS ERITRÒCITS EN EL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS.

III.1.1. Plantejament experimental.

L'objectiu d'aquesta part fou estudiar la contribució dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids. Hem emprat un model de diferències arteriovenoses a través de diferents òrgans i teixits de la rata, com l'aproximació més real als balanços dels diferents teixits.

Per tal d'obtenir una visió ample dels moviments interòrgans hem escollit els teixits i òrgans que en principi més hi contribueixen, com són l'intestí, el fetge, el ronyó, els teixits drenats per la vena jugular (principalment cervell) i els teixits drenats per la vena il·liaca (principalment múscul).

Les mesures d'aminoàcids han estat realitzades tant en sang total com en plasma, la qual cosa ens permet, corregint-ho per l'hematòcrit, estimar la contribució dels eritròcits en el transport "in vivo" d'aminoàcids, contribució que hem pogut quantificar en mesurar el flux sanguini de cadescuna de les venes anteriorment citades.

III.1.2. Animals.

S'han utilitzat rates femelles verges de la raça Wistar (Rattus norvegicus) de l'animalari de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Les rates es mantingueren en condicions ambientals controlades de temperatura (22 C ± 1) i d'humitat (80-90%), i estigueren sotmeses a un ritme diari de 12 hores de foscor i 12 hores de llum artificial (8.30 matí-8.30 nit). Els

animals tenien lliure accés al menjar i a la beguda.

III.1.2.2. Dieta

La dieta dels animals fou del tipus A.04 (rata-ratolí, manteniment) en forma de grànuls d'uns 15 mm de diàmetre de la casa Panlab (Barcelona, Espanya), amb un valor calorífic de 2.9 cal./g i la següent composició:

	<u>g/Kg</u>
Humitat	120
Proteïna	170
Lípids	30
Glúcids	587
Cel.lulosa	43
Minerals	50

complementada amb un complex vitamínic adequat.

III.1.3. Obtenció de mostres.

Per a utilitzar el mètode de les diferències arteriovenoses és important extreure sang de la vena i de l'artèria del mateix animal. Donada la quantitat de venes que havíem escollit i de la quantitat de mostre que s'ha d'extreure, era impossible la utilització d'un sol animal per a totes les diferències arteriovenoses. Per aquest motiu vam creure oportú fer els següents grups experimentals :a) extracció de sang de la vena hepàtica, vena porta i artèria aorta. Amb aquest grup obteníem, doncs, el balanç intestinal, l'hepàtic i el del llit esplàncnic. b) extracció de sang de la vena jugular , de la vena renal i de l'artèria aorta. Amb aquest grup obteníem el balanç renal i el dels teixits drenats per la vena jugular (cervell). c) extracció de sang de la vena il.líaca i de l'artèria aorta. Amb aquest

grup obteniem el balanç dels teixits drenats per la vena il·liaca (múscul). Cadascun d'aquests grups estava format per 10 animals. D'aquesta forma, els fluxos globals interòrgans corresponen a més d'un animal, però asseguràvem la obtenció d'una mostra arterial junt a cada vena, i així els càlculs de les diferències arteriovenoses es podien fer fe forma individual.

S'utilitzaren rates femelles d'uns 220-260 g de pes corporal. Al principi del període de llum (8.30 A.M.) s'aneste siaven els animals amb una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (50 mg/kg rata). Un cop adormides (5-10 minuts després de la injecció) es procedia a visualitzar la vena que procedís. La sang s'extreia amb una cànula acabada en agulla (Nipro, 0.65x19 mm) connectada a una xeringa de 5 ml prèviament heparinitzades i seques (heparina Analema diluïda 1/10 amb aigua destil·lada). Un cop feta l'extracció de sang s'hi posava un cotó-fluix amb salí per evitar hemorràgies i es procedia a extreure sang de la següent vena o de l'artèria. En total el procés no durava més de 2 o 3 minuts per rata. L'ordre d'extracció era sempre el mateix, essent l'artèria aorta l'última, ja que en aquesta és molt difícil d'aturar l'hemorràgia i a més a més, hi havia el perill, en parar l'hemorràgia, de col·lapsar tot el sistema circulatori i no poder obtenir les mostres venoses.

Com veiem, la mostra arterial sempre ha estat de l'artèria aorta. Això es degut a que s'assumeix que la concentració arterial de qualsevol substància és la mateixa en totes les artèries (Rémésy i col., 1983; Brosnan i col., 1983 entre d'altres). De cada vas sanguini s'extreia de 0.8 a 1 ml de sang i per tant de cada animal, com a màxim, s'extreia 3 ml de sang. Segons la bibliografia (Brosnan i col., 1983) aquesta quantitat extreta no afecta les

determinacions de les diferències arteriovenoses.

III.1.4. Tractament de les mostres.

Les mostres de sang eren posades en gel immediàtament després de l'extracció. Del volum extret de sang per mostra se'n treien dues alíquotes. D'una d'elles s'obtenia el plasma per centrifugació a 2000 rpm durant 30 min. a 4 °C (MSE Coolspin). El plasma es separava del precipitat cel.lular per aspiració amb una pipeta Pasteur i es guardava en fred. Un cop teniem sang i plasma de cada mostra es procedia a desproteïnitzar-les per a la valoració d'aminoàcids lliures (vegeu apartat III.1.6).

III.1.5. Determinació de l'hematòcrit.

L'hematòcrit s'estimava per un mètode de microhematòcrit. Una petita quantitat de sang (30-50 µl) es posava en un capilar, per duplicat, de microhematòcrit (Brand), es tancava (Critoseal) i es centrifugava en una centrifuga Sigma 101M amb un rotor especial de microhematòcrit a 12000xg durant 3min. Un cop feta la centrifugació, amb l'ajut d'un regle es mesurava el volum existent total (en ser el diàmetre del capilar constant) i el percentatge que representava les cèl.lules precipitades. D'aquesta forma s'obtenia l'hematòcrit en % del volum sanguini. Aquesta mesura es feia per totes les mostres de sang extretes.

Per estimar la quantitat de plasma que hagués pogut quedar atrapat entre les cèl.lules precipitades, que ens donaria una sobrestimació del valor d'hematòcrit, es realitzaren unes proves amb U-¹⁴C sacarosa (Amersham) d'alta activitat específica (20.46 GBq/mmol ó 552 mCi/mmol) que s'afegí a unes mostres de sang. Un cop barrejades es mesurà

L'hematòcrit i es determinà la radioactivitat tant del plasma sobrenadant com del precipitat cel.lular, després d'haver-lo separat del plasma asserrant el capilar i de precipitar les proteïnes cel.lulars per tal d'evitar els alts nivells d'emascarament en la mesura de la radioactivitat, donats sobretot per la gran quantitat d'hemoglobina. Els càlculs realitzats ens demostraren que en les nostres condicions el plasma atrapat era inferior al 1% del volum cel.lular, i per tant, no ferem cap correcció del valor hematòcrit obtingut.

III.1.6. Determinació d'aminoàcids lliures.

-Fonament

L'anàlisi d'aminoàcids s'ha realitzat mitjançant el mètode de l'autoanàlisi. Aquesta tècnica es basa en una separació dels diferents aminoàcids i una posterior quantificació. La separació dels diferents aminoàcids es realitza mitjançant una resina de bescanvi iònic (catiònica) com a fase estacionària i la seva posterior elució amb un gradient de pH (Morris i Morris, 1976). Quan el pH del tampó correspon al pH isoelèctric de l'aminoàcid, aquest és arrossegat per l'eluent.

La detecció dels aminoàcids eluits es fa mitjançant una reacció amb l'ortoftalaldehid (OPA) que dóna un compost fluorescent, detectable fluorimètricament i que permet una gran sensibilitat (fins a 2 nmols).

-Aparells i Material

L'aparell era un Rank-Hilger dotat dels següents mòduls:

- Unitat cromatogràfica CHROMASPEC S180 que separa els diferents aminoàcids mitjançant una columna de bescanvi iònic.
- Detector fluorimètric FLUROIMETER S143
- Registrador CDS 111C que grafica els pics eluits.
- Integrador VARIAN CDS que mesura les àrees dels pics i per tant permet la seva quantificació.

-Condicions de treball

- Columna d'acer inoxidable 136 de 350 mm de llarg, plena d'una resina de poliestiré sulfonat (àcid fort) de 5-6 μ de diàmetre i carregada en forma Li^+ (Rank-Hilger).
- Solucions amortidores. Tampó àcid I pH=2, àcid cítric i clorur de liti. Tampó àcid II pH=2, àcid cítric, metanol i tioglicol pel rentat de la columna durant els primers 5 min.. Tampó bàsic pH=12, àcid cítric, hidròxid de liti, àcid bòric i EDTA.
- Gradient sigmoidal entre pH 2.5 i 12
- Flux 215 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
- Temps 4 hores d'elució
- Temperatura: controlada per termostat, 40°C de 0 a 70 min. 60°C de 70 a 150 min. i 40°C de 150 a 240 min.
- Volum de la mostra injectat: 75 μl .

-Quantificació

Per a quantificar la concentració d'aminoàcid de les mostres s'utilitzaren dos tipus de patrons: el patró intern

(norleucina, NLE), que s'afegia a cada mostra a una concentració final coneguda (50 μM) i que ha d'ésser un aminoàcid que no es trobi en medis biològics, i el patró extern, que és una combinació dels diferents aminoàcids en una concentració coneguda (en el nostre cas 50 μM) que es passava per l'autoanalitzador con si es tractés d'una mostra, cada 4-6 mostres experimentals, i ens permet conèixer la recuperació de cada aminoàcid. Així doncs, per cada mostra analitzada teniem l'àrea del pic i la concentració de NLE, i l'àrea del pic dels diferents aminoàcids. Així podem calcular una concentració aparent per cada aminoàcid:

$$C_a = \text{àrea AA}_i / \text{àrea NLE} \times \text{concentració de NLE}$$

Òbviament, aquesta concentració només seria certa si els diferents aminoàcids tinguessin la mateixa recuperació que la NLE. Per a determinar quina és realment aquesta recuperació de cada aminoàcid en relació a la NLE s'utilitza el patró extern, fent la següent relació per a cada aminoàcid:

$$R_i = (\text{àrea AA}_i / \text{conc. AA}_i) / (\text{àrea NLE} / \text{conc. NLE})$$

en el patró extern.

Ara podem calcular la concentració real dels diferents aminoàcids fent:

$$C_{\text{real}} = C_a \times R_i$$

que haurà d'ésser corregida pels diferents factors de dilució que s'hagin fet.

-Tractament de les mostres

75 µl de les mostres de sang i plasma obtingudes i processades segons es descriu en els apartats III.1.3 i III.1.4. foren desproteïtzades en fred amb l'adició de 100 µl d'àcid tricloracètic (Sigma) al 10%, fortament barrejades i centrifugades 30 min a 2000 rpm a 4 °C. El sobrenadant transparent i net es recollia i se n'agafaven 75 µl per a la valoració d'aminoàcids i es guardaven congelades a -40 C fins el moment de la valoració, moment en que s'hi afegia 75 µl d'una solució 100 µM de NLE (concentració final, doncs, de 50 µM. Vegeu més amunt). 75 µl d'aquesta barreja es passaven per l'autoanalitzador, tal i com hem explicat anteriorment.

III.1.7. Càlcul de la compartimentació sanguïnia i de la concentració intracel.lular d'aminoàcids.

-Compartimentació sanguïnia.

Donat que a nosaltres ens interessa calcular la contribució que puguin tenir els eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids, hem de conèixer la concentració d'aquests dins dels eritròcits. La forma que hem utilitzat per a calcular-la, si bé indirecta, és més precisa i segura que el mètode directe de lisar les cèl.lules i mesurar la concentració en el sobrenadant desproteïtzat, ja que el procés d'aïllament i rentat de les cèl.lules produeix una considerable pèrdua d'una part important dels aminoàcids intraeritrocitaris, sobretot d'essencials (Hagenfeldt i Arvidson, 1980).

El càlcul emprat és la següent obvietat:

$$C_s = C_p \times (1-H) + C_{es} \times H$$

on Cs: concentració d'aminoàcids en sang

Cp: concentració d'aminoàcids en plasma

H: hematòcrit en tant per l

Ces: concentració d'aminàcids en la fracció eritrocitària de la sang.

És a dir, que multiplicant l'invers de l'hematòcrit en tant per l, per la concentració en plasma obtenim la concentració en la fracció plasmàtica de la sang (és a dir, per unitat de volum de sang, no de plasma). Per tant, si a la concentració en sang total li restem la concentració de la fracció plasmàtica d'aquesta, obtindrem la concentració en la fracció corpuscular (principalment intraeritrocitària) de la sang. Es a dir:

$$Ces = Cs - Cp \times (1-H)$$

Totes les dades han estat calculades de forma individual, no només per rata, sinó també per cada vas sanguini d'on s'extregué mostra.

-Concentració intracel.lular d'aminoàcids.

La concentració intracel.lular (intraeritrocitària) d'aminoàcids ens interessa per tal de poder comparar-la amb la del medi (en aquest cas plasma).

Per a calcular la concentració intracel.lular ens basarem en les dades de compartimentació sanguina calculades com més amunt s'explica. Havíem calculat la concentració d'aminoàcids en la fracció corpuscular de la sang (Ces). Si aquesta la dividim per l'hematòcrit en tant per l obtindrem la concentració per volum cel.lular (és a dir, per exemple $\mu\text{mols/litre}$ de cèl.lules):

$$C_e = C_{es} / H$$

on C_e : concentració d'aminoàcids en les cèl.lules

C_{es} : concentració d'aminoàcids en la fracció corpuscular de la sang

H: hematòcrit en tant per 1

Ara bé, aquest tipus d'expressió no és comparable a la concentració plasmàtica ($\mu\text{mols/litre}$ de plasma). Per a poder-ho fer realment comparable ho haurem d'expressar per unitat de volum d'aigua dels dos compartiments, sent aquesta l'única forma de saber si els aminoàcids estan més o menys concentrats en les cèl.lules que en el plasma que les envolta. Necessitem saber, doncs, el contingut d'aigua tant del plasma com de les cèl.lules. El mètode que emprarem fou aplicar els càlculs de compartimentació sanguinària i de concentració intracel.lular però per a la concentració d'aigua. El procediment fou el següent:

Mostres de sang i de plasma es pesaren sobre paper d'alumini prèviament tarat i foren deixades a l'estufa a 110°C durant 36 hores. Passat aquest temps, es pesà el residu sec que quedava i es calculà el % d'aigua en sang i en plasma. Un cop fets aquests càlculs aplicarem les equacions que hem explicat en aquest mateix apartat.

Amb els valors obtinguts del % d'aigua en eritròcits i plasma corregirem els valors de concentracions d'aminoàcids expressades en $\mu\text{mols/l}$ de cèl.lules o per l de plasma obtenint l'expressió $\mu\text{mols/l}$ d'aigua intracel.lular (AIC) o per l d'aigua plasmàtica (AP).

III.1.8. Comprovació de l'estat dels animals.

El mètode que hem emprat per a fer les diferències

arteriovenoses d'aminoàcids (vegeu apartat III.1.3.) requereix l'ús d'anestèsia i de processos relativament invasius com són la visulització i neteja dels vassos sanguinis (i per tant, la seva manipulació), així com l'extracció d'un volum de sang considerable. Per altra banda, és conegut que el flux interòrgans d'aminoàcids, especialment de glutamina, pot estar alterat en situacions d'acidosi i d'altres (Brosnan i col., 1983 entre d'altres). Aquestes raons ens indicaren la conveniència de comprovar l'estat dels animals en les condicions en que s'extreien les mostres de sang. Aquesta comprovació es realitzà mesurant la pressió parcial d'O₂ de CO₂ i el pH de la sang extreta de tots els vassos sanguinis d'on s'extregué mostra per a la mesura d'aminoàcids, seguint el mateix protocol experimental que el descrit en l'apartat III.1.3.

III.1.8.1. Determinació del pO₂, pCO₂ i pH sanguinis.

La determinació del pO₂, pCO₂ i pH sanguinis es realitzà en una unitat electrònica BMS 3 MK2 Blood Micro System (Radiometer, Copenhague) compacta, termostatitzada que té incorporat un microelectrode de pH, un electrode de pO₂ i un electrode de pCO₂ per a la determinació directa d'aquests paràmetres.

-mesura del pH

El microelectrode de pH és un electrode capilar de vidre que necessita un volum de mostra de 40 µl, que està muntat en un cap electròdic transparent, mòbil i termostatitzat. Per omplir l'electrode amb la mostra ó amb les solucions tampó d'ajust s'utilitza una bomba de succió incorporada, i la lectura és pràcticament instantània.

-mesura del $p\text{CO}_2$.

El funcionament de l'electrode de $p\text{CO}_2$ es basa en la relació que hi ha entre el pH, la concentració de CO_2 i la concentració de bicarbonat en una solució de bicarbonat sòdic:

$$K_s = (\text{HCO}_3^-) (\text{H}^+) / (\text{CO}_2)$$

Si la solució de bicarbonat i la barreja de gassos que conté CO_2 estan en equilibri, per la llei d'Henry, és possible predir la proporcionalitat entre la concentració de CO_2 de la barreja de gassos i de la solució:

$$(\text{CO}_2) = K \times p\text{CO}_2$$

de la qual s'obté

$$\log (p\text{CO}_2) = -\text{pH} + \log (\text{HCO}_3^-) + \text{pK} - \log K$$

Així el pH de la solució de bicarbonat té una dependència linial amb el $\log p\text{CO}_2$ quan s'estableix l'equilibri.

En l'electrode de $p\text{CO}_2$ es mesura el pH en una solució de $\text{NaHCO}_3 + \text{NaCl}$ amb un electrode de vidre especial, tenint un electrode de referència de clorur de plata/plata. L'equilibri amb el gas s'estableix per difusió a través d'una membrana de tefló. La solució s'equilibra en 2 minuts aproximadament.

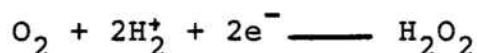
- $p\text{O}_2$

L'electrode de $p\text{O}_2$ és un electrode polarogràfic que té un càtode de platí i un ànode de clorur de plata/plata,

col.locat en una solució electrolítica i separat de la mostra per una membrana de plàstic, permeable als gassos, de polipropilè.

La solució electrolítica és un tampó fosfat al qual s'ha afegit KCl per estabilitzar el potencial de l'ànode (electrode de referència). Entre els dos electrodes s'aplica un voltatge polaritzant d'aproximadament 650 mV.

L'electrode de platí es col.loca aprop de la membrana i, donat el voltatge polaritzant, l'oxigen que difon a través de la membrana serà reduït en l'electrode de platí.



Aquest procés de reducció produeix un corrent elèctric a través de l'electrode de pO_2 . Donat que la pO_2 fora de la membrana és la que determina la difusió de l'oxigen, el corrent generat serà proporcional a aquesta pressió. En les condicions d'aquest electrode de pO_2 el corrent serà d'aproximadament 10^{-11} amps per mmHg d'oxigen a 38°C .

Els electrodes de pCO_2 i pO_2 es col.loquen en íntim contacte dins del bany termostatitzat de tal manera que les seves membranes es troben una front de l'altre formant una "cambra de mesura anaeròbica" de la qual s'omple l'electrode de pH. La mostra necessària per a la determinació dels tres paràmetres és d'uns 140 μl , i la lectura és digital pels tres paràmetres.

L'electrode de pCO_2 s'ha de calibrar amb dos gassos de diferent, però coneguda, pressió de CO_2 (un d'alta pressió de CO_2 : 26.38% i un de baixa: 3.7%) que es poden seleccionar mitjançant un selector de gassos de forma que la cambra de mesura abans esmentada pot ser omplerta amb els dos tipus de

gas de forma consecutiva. Abans d'entrar a la cambra, però, els gassos passen a través d'humidificadors per a saturar-los amb vapor d'aigua. Així s'evita la pèrdua ó la captació de vapor d'aigua de la solució electrolítica de l'electrode de $p\text{CO}_2$.

L'electrode de $p\text{O}_2$ es calibra amb una solució lliure d'oxigen i amb aigua termostatitzada equilibrada amb l'aire (20.9% d'oxigen).

III.1.9. Mesura del flux sanguini.

Per a estudiar si els eritròcits tenen algú paper, ó no, en el flux interòrgans d'aminoàcids n'hi ha prou en mesurar les diferències arteriovenoses de la compartimentació sanguinia, però hem volgut, a més a més, poder quantificar aquesta contribució i poder-la comparar entre els diferents teixits. Per aconseguir aquesta quantificació són necessaris els fluxos sanguinis de les venes d'on s'ha extret mostres.

Per a la mesura dels fluxos sanguinis, actualment es disposa de diferents mètodes, més ó menys precisos i més ó menys generals. Des de la infusió de traçadors ó marcadors no radioactius, com l'àcid aminohipúric, fins la tècnica de les microesferes radioactives, passant per mètodes electromagnètics. Nosaltres hem escollit la reometria electromagnètica per diferents motius. Es un mètode relativament senzill, ràpid de realitzar, precís i molt repetitiu. A més a més, presenta el, per a nosaltres, gran avantatge de donar la mesura del flux sanguini de la pròpia vena d'on s'ha extret sang. Hem de tenir present que el mètode de les microesferes radioactives (un dels més emprats actualment) dóna el flux arterial d'un teixit determinat, i és relativament difícil que en extreure sang de les

diferents venes per a realitzar les mesures de les diferències arteriovenoses, aquestes venes únicament drenin un sol teixit cadascuna d'elles. Per exemple si es vol mesurar la diferència artèria aorta-vena porta tindrem algun problema, en calcular el flux d'aquesta vena, per identificar quins teixits, i en quina proporció, són drenats per aquesta vena, ja que sabem que apart de l'intestí prim, també ho són el pàncreas, la melsa, teixits adiposos que hi hagi, etc. Això, encara és molt més greu en els casos de la vena il·líaca, que en absolut podem assumir que dreni únicament múscul de la pota, i de la vena jugular que recull sang que a passat a través del cervell i de la musculatura de la cara.

-Fonament

El mètode es basa en la producció, per un electroimant que es col·loca al voltant del vas sanguini, d'un camp magnètic a través d'aquest vas. El moviment de la sang a través d'aquest camp magnètic genera un voltatge induït proporcional a la velocitat i, conegut el diàmetre del vas, aquest voltatge induït és també proporcional al flux volumètric.

-Aparell

Utilitzarem un Electromagnetic Flowmeter (Carolina Medical Electronics), el qual consta d'un aparell central on hi resideixen els circuits electrònics i filtres per aconseguir "netejar" el senyal elèctric que li arriba de la sonda, i els selectors d'ajust, de correcció per l'hematòcrit, així com la sortida del valor mesurat que és en forma digital. Apart d'aquest mòdul central, existeixen un conjunt de sondes electromagnètiques de diferent diàmetre de la sèrie 400.

-Procediment

Les rates s'utilitzaren en les mateixes condicions que les descrites en l'apartat III.1.3.

Abans de començar amb l'animal, l'aparell s'havia d'ajustar a zero, la qual cosa es feia introduint la sonda electromagnètica en un recipient amb salí (NaCl 0.9%) i col·locant el selector d'ajust a zero, estant desconectat el mesurador de flux. Per a comprovar el funcionament es procedia a connectar el mesurador de flux i a moure la sonda dins del recipient i s'observava l'indicador de flux.

Un cop l'animal estava anestesiàt (vegeu apartat III.1.3.) es procedia a netejar una part de la paret de la vena en la que es volia mesurar el flux sanguini. Les parets de la vena han d'estar totalment netes per a utilitzar aquest mètode, ja que si no fos així les interferències i "soroll de fons" de l'aparell augmenten de forma exponencial, i disminueix la sensibilitat i precisió de la mesura i la veracitat del resultat. Un cop neta la paret de la vena a mesurar s'hi col·locava al voltant la sonda electromagnètica. Aquest és el punt clau de la tècnica donat que és absolutament necessari que la vena encaixi perfectament en l'espai interior de la sonda, de forma que el contacte paret de la vena i sonda sigui perfecte en tota la circumferència. Es per això que s'havia de comprovar, utilitzant sondes de diferents diàmetres fins a trobar un encaix perfecte. S'ha comprovat de forma experimental que per una bona mesura, la sonda ha d'apretar la vena contraint el diàmetre del vas en un 10-20%. Aquesta petita constricció no té cap efecte en la mesura, però una menor o més gran si que la té (Gasking, 1972; Wyatt, 1984).

S'ha de tenir en compte, que si bé el diàmetre intern

de la sonda usada generalment era només de 2.87 mm, la carcassa que protegeix els electrodes era considerablement grossa, i això dificultava la implantació de la sonda en certes venes com la renal i la hepàtica, essent la primera molt curta i la segona estant situada tocant el diafragma, havent-hi poc espai per moure's.

Un cop implantada la sonda, es conectava el medidor de flux i l'aparell donava els ml/min del flux sanguini. Per a assegurar-nos-en del valor obtingut sempre es comprovava de la següent manera: Un cop llegit el flux, es col.lapsava la vena aprop de la sonda i el flux baixava a zero, seguidament es deixava recuperar el flux de la vena i es feia una altra lectura que havia d'ésser igual a la primera. Quan aquestes proves no donaven la resposta adequada es tornava a començar o es rebutjava la rata.

III.1.10. Càlcul del balanç net d'aminoàcids.

La captació o alliberament net d'aminoàcids pels diferents teixits estudiats ha estat calculada fent la diferència de concentracions entre l'artèria i la vena (diferències arteriovenoses) tant mesurades en sang total com en compartimentació sanguinària, i multiplicant el valor promig d'aquesta diferència pel flux de la vena mesurat pel mètode de la reometria electromagnètica. Hem considerat, doncs, que el flux de la vena serà igual a l'arterial, i que, com ja hem comentat anteriorment, la concentració d'aminoàcids en la vena aorta serà el mateix que en qualsevol altra artèria. Per tant:

$$Baa = (Aaa - Vaa) \times Fs$$

on Baa: balanç net d'un aminoàcid a través d'un teixit

Aaa: concentració d'un aminoàcid en l'artèria (en sang)

total ó en qualsevol dels dos compartiments sanguinis).

Vaa: concentració d'un aminoàcid en la vena

Fs: flux sanguini de la vena

Quan les concentracions són expressades en nmols/ml (μM) i el flux sanguini en ml/min., aleshores el balanç de l'aminoàcid (Baa) vindrà donat en nmols/min.

Aquests càlculs han estat aplicats pels balanços intestinal (diferència aorta-vena porta), del llit esplàncnic (diferència aorta-vena hepàtica), renal (diferència aorta-vena renal) dels teixits drenats per la jugular (diferència aorta-vena jugular) i dels teixits drenats per la il.liaca (diferència aorta-vena il.liaca).

Òbviament, pel cas del balanç hepàtic aquest raonament no és aplicable, ja que si bé el fetge té una sola sortida venosa (vena hepàtica) té, en canvi, dues entrades (vies aferents: vena porta i artèria hepàtica), contribuint cadascuna d'elles al balanç hepàtic en funció del seu flux.

Pel cas del fetge, doncs, hem calculat el flux de cada aminoàcid en nmols/min. pels tres vasos sanguinis implicats en el balanç hepàtic, fent:

$$F_{aa} = C_{aa} \times F$$

essent F_{aa} : flux de cada aminoàcid en nmols/min.

C_{aa} : concentració de cada aminoàcid en un dels vasos sanguinis en nmols/ml

F : flux sanguini del vas corresponent

Un cop calculat això per a cada valor individual, aleshores aplicarem la següent equació:

$$\text{BHaa} = (\text{FaaAH} + \text{FaaVP}) - \text{FaaVH}$$

essent BHaa: balanç hepàtic per un aminoàcid

FaaAH: flux d'un aminoàcid en l'artèria hepàtica

FaaVP: flux d'un aminoàcid en la vena porta

FaaVH: flux d'un aminoàcid en la vena hepàtica

III.2. PART 2: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN ERITRÒCITS "IN VITRO".

III.2.1. Plantejament experimental.

Un cop estudiada la contribució dels eritròcits en el transport d'aminoàcids entre els òrgans, vam creure convenient iniciar l'estudi de les característiques del transport "in vitro" de diferents aminoàcids en els eritròcits, per a comprovar fins a quin punt podriem relacionar el transport observat "in vivo" amb les propietats del transport "in vitro", ja que, com hem comentat en la introducció, existeixen grans discrepàncies entre aquests dos processos.

III.2.2. Obtenció dels eritròcits.

Partírem d'animals sotmesos a les mateixes condicions que les descrites en l'apartat III.1.2, i foren aneste siats tal i com s'explica en l'apartat III.1.3. Els eritròcits s'obtingueren sempre de sang arterial (a. aorta). L'extracció de sang es realitzava tal i com es descriu en l'apartat III.1.3, però la quantitat extreta fou de 6-8 ml per animal i no es mantenia en gel, sinó que immediàtament es procedia al rentat de les cèl.lules.

III.2.3. Rentat dels eritròcits.

Pel rentat dels eritròcits seguirem bàsicament els protocols descrites en la bibliografia amb algunes petites modificacions (Young i Ellory, 1982 entre d'altres).

-Procediment

Col.locàvem 1 ml de sang en un tub de plàstic de fons

rodó de 10 ml de capacitat (on feiem tot el procés de rentat), seguidament hi afegíem 8 ml del medi de rentat adequat (vegeu apartat III.2.4). Barrejàvem per inversió suau i es centrifugava durant 10 min. a 4 °C i a 2000 rpm (MSE Coolspin) per a precipitar les cèl.lules. Un cop centrifugats els tubs s'aspirava el sobrenadant amb una pipeta pasteur connectada a una bomba d'aigua, tenint molta cura d'aspirar també les primeres capes del precipitat (el que s'anomena buffy coat), és a dir capes de cèl.lules on hi predominen els leucòcits, així com greix. Seguidament s'hi afegien 8 ml més del mateix medi i es resuspenien les cèl.lules amb agitació suau, i es tornava a centrifugar. Aquest procés es repetia 3 cops. Un cop feta l'última extracció de sobrenadant es resuspenien els eritròcits fins a un hematòcrit del 20-30% en el medi adequat. Les cèl.lules quedaven ja llestes pel seu ús en l'estudi del transport d'aminoàcids.

III.2.4. Medis.

Els medis emprats en el rentat dels eritròcits així com a medi d'incubació en els estudis de transport són basats en la bibliografia (Young i Ellory, 1982 entre d'altres) amb lleugeres modificacions. Els medis que es fan servir pel rentat i les incubacions són els mateixos i estaven constituïts per:

- tampó HEPES, pH 7.4 a 37 °C, 15 mM
- MgSO₄ 2 mM
- KCl 145 mM
- Glucosa 5mM

tots en aigua desionitzada.

Les primeres proves mostraren que durant el procés de

rentat i d'incubacions posteriors hi havia un cert grau d'hemòlisi, evidenciat pel color rojenc del sobrenadant. Inaba i Maede (1984), en estudis de transport de glutamat i aspartat en eritròcits de gos, descriuen i usen albúmina (fracció V, Sigma) al 0.1% per evitar l'hemòlisi sense veure cap mena d'alteració en el transport degut a la presència de l'albúmina. Així, doncs, el medi el completarem amb albúmina al 0.1% i observarem que l'hemòlisi s'evitava totalment. Totes aquestes solucions estan a la concentració final. Per a la preparació del medi utilitzàvem aquests components 10 vegades més concentrats (en aquesta concentració es guardaven a 4 C i es renovaven cada 3 ó 4 dies). Just abans d'extreure sang de l'animal es preparava el medi diluint les solucions 1/10 en aigua desionitzada.

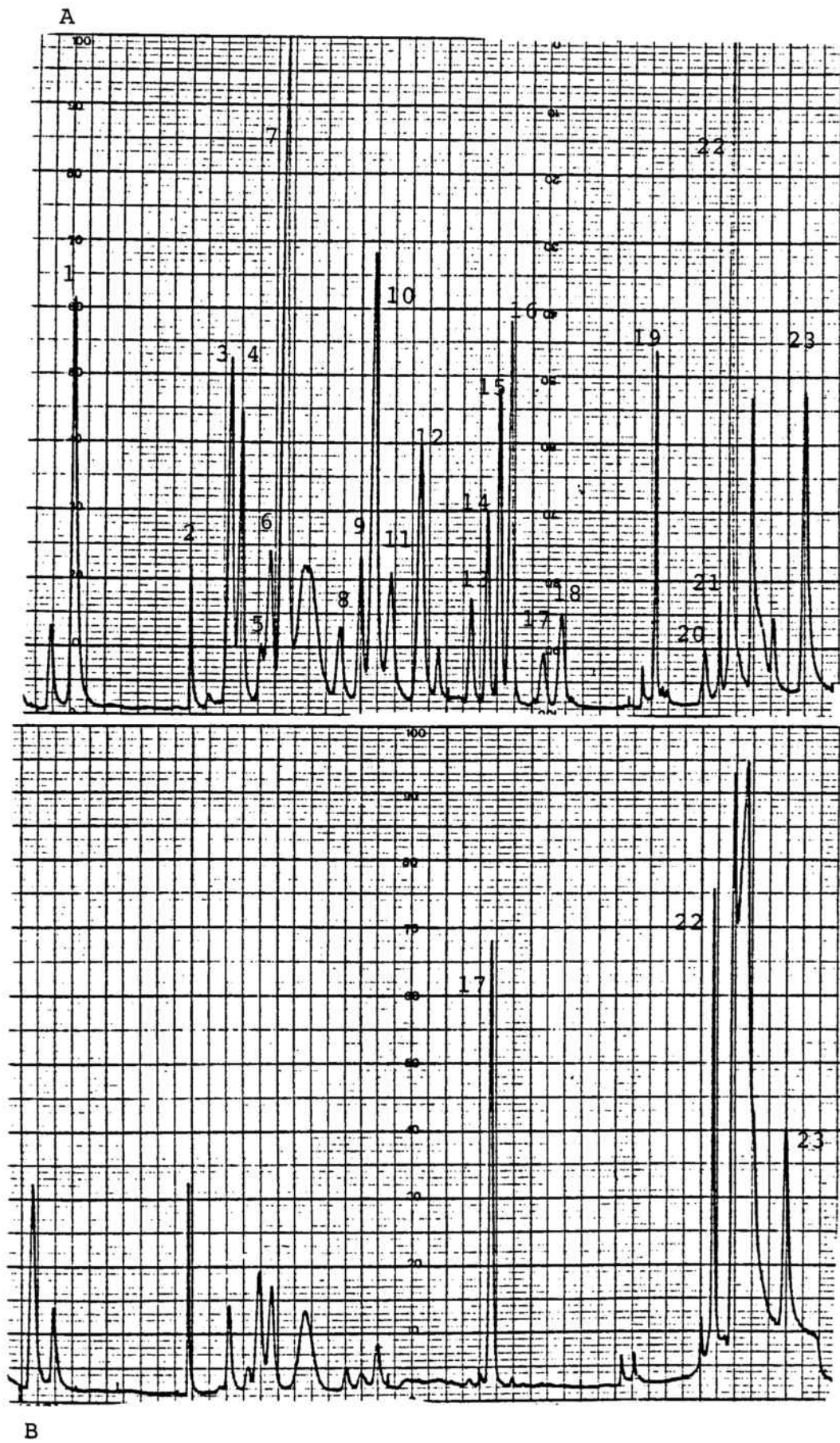
III.2.5. Buidament d'aminoàcids.

El buidament d'aminoàcids dels eritròcits el realitzàvem incubant les suspensions cel.lulars en el procés de rentat (apartat III.2.3) entre els passos de resuspensió i centrifugació a 37 C durant 15 minuts. Foren, doncs, 3 incubacions en total i com s'observa en la fig III.2.5.1 això fou suficient per a la majoria d'aminoàcids, sobretot els ramificats, però menys eficaç per la lisina. Es considerà, però, que més temps d'incubació podria alterar les cèl.lules abans de començar els estudis de transport pròpiament dits. Aquest buidament d'aminoàcids intraeritrocitaris es dóna simplement per equilibració amb un medi carent d'aminoàcids, el qual es renova a cada incubació.

III.2.6. Diferents paràmetres estudiats en els eritròcits.

El transport es pot expressar de moltes formes diferents: referit a litre de cèl.lules, a aigua

Fig. III.2.5. BUIDAMENT D'AMINOACIDS DELS ERITROCITS. A- Cèl.lules sense incubar. B- Després de 3X15 min. d'incubació a 37°C. Pics: 1-tau,2-asp,3-thr,4-ser,5-asn,6-glu,7-gln,8-pro,9-gly,10-ala,11-cit,12-val,13-met,14-iso,15-leu,16-nle,17-tyr,18-phe,19-his,20-trp,21-orn,22-lys,23-arg. A està 3 vegades més concentrat que B



intracel.lular, a gram d'hemoglobina, a nombre de cèl.lules, etc. Donades aquestes diferents formes d'expressió vam decidir estudiar les equivalències entre elles de forma que a partir d'una expressió determinada poguèssim tenir totes les altres.

III.2.6.1. Hematòcrit i aigua intracel.lular

Les determinacions de l'hematòcrit i del contingut d'aigua cel.lular es realitzaren segons el descrit en els apartats III.1.5 i III.1.7 respectivament.

III.2.6.2. Densitat de les cèl.lules.

Per mesurar la densitat de les cèl.lules s'utilitzà un volum conegut de cèl.lules compactades i es pesà. Els valors obtinguts molt propers a 1 ens indicaren que no era necessari fer cap mena de correcció en passar d'unitats d'hematòcrit a unitats de pes de cèl.lules.

III.2.6.3. Determinació d'hemoglobina.

Per a la mesura de l'hemoglobina total s'ha emprat un mètode espectrofotomètric clàssic basat en el descrit per Stadie (1920) i simplificat i millorat posteriorment per Drabkin i Austin (1935), comercialitzat en forma de kit per Sigma, CO (Estats Units).

-Fonament

El mètode es basa en la oxidació a methemoglobina de l'hemoglobina i tots els seus derivats, exceptuant la sulfhemoglobina, en presència de ferricianur potàssic a pH alcalí. La methemoglobina reacciona posteriorment amb cianur potàssic per a formar cianmethemoglobina, la qual presenta

un pic absorció a 540 nm.

-Reactius

-Reactiu de Drabkin: consisteix en una barreja de 100 parts de bicarbonat sòdic, 20 parts de ferricianur potàssic i 5 parts de cianur potàssic. Aquesta barreja, que ve preparada, es dilueix amb 1000 ml d'aigua.

-Brij-35. Solució al 30%

-Patró d'hemoglobina: Methemoglobina humana liofilitzada.

-Procediment

Preparació de la solució de Drabkin: a 1 litre del reactiu de Drabkin diluït s'afegeix 0.5 ml de la solució Brij-35 al 30% i es barreja bé.

Preparació de la solució patró de cianmethemoglobina: Es reconstitueix el vial patró d'hemoglobina amb 5 ml de la solució de Drabkin. Es barreja bé i es deixa reposar un mínim de 30 minuts.

Recta patró: La realitzarem amb una sèrie de tubs de concentració creixent d'hemoglobina (0-18 g/100ml) a partir de la solució patró de cianmethemoglobina, diluint-la amb diferents volums de la solució de Drabkin i llegint l'absorbància a 540 nm.

La quantificació d'hemoglobina en les mostres es feu afegint a 5 ml de la solució de Drabkin 20 µl de sang, deixant-ho reposar 15 minuts a temperatura ambient i llegint l'absorbància a 540 nm. Quan la mostra no era sang sinó una suspensió d'eritròcits aleshores el volum variava en funció de l'hematòcrit, mantenint-se, però, la mateixa proporció

que en el cas de la sang.

III.2.6.4. Comptatges cel.lulars

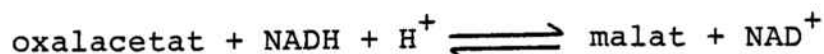
El comptatge cel.lular es va realitzar per un mètode electrònic amb un aparell Coulter (Coulter Electronics Ltd, Anglaterra). Es fa passar una suspensió d'hematies per un forat molt petit, pel qual passa un corrent elèctric; quan hi ha una interrupció en el pas del líquid diluïent (conductor), es produeix un augment de resistència en l'orifici. El pas de cada cèl.lula produeix un impuls per canvi de voltatge, de curta durada i d'una amplitud proporcional al volum de la cèl.lula (Brecher i col., 1956). La lectura d l'aparell Coulter és digital.

III.2.6.5. Determinació de l'aspartat transaminasa (GOT).

Per a la determinació de l'activitat aspartat transaminasa (E.C.2.6.1.1, GOT, glutamat-oxalacetat transaminasa) ens basarem en un mètode descrit inicialment per Henry i col. (1960) i modificat posteriorment per Amador i Wachter (1962) i per Trivedi i col. (1977), i preparada en forma de kit per ITC diagnostics (Estats Units).

-Fonament

El mètode es basa en la disminució de l'absorbància a 340 nm que succeeix en oxidar-se el NADH a NAD^+ per la següents reaccions acoblades:



-Reactius: Vial amb la següent composició

- L-aspartat 133 mmols/l
- 2-oxoglutarat 65 mmols/l
- NADH 0.23 mmols/l
- àcid oxàmic 25.3 mmols/l
- malat deshidrogenasa > 1000 µ/l
- tampó fosfat pH: 7.4, 52.9 mmols/l

el vial s'ha de reconstituir amb 16 ml d'aigua destil·lada, agitant suaument.

-Procediment

La reacció es realitzava a 37°C per la qual cosa s'havia de preescalfar el reactiu durant 2 ó 3 minuts. Un cop a temperatura, a 3 ml del reactiu s'hi afegia un volum determinat d'eritròcits lisats, dependent de l'hematòcrit ó 200 µl de plasma. Es barrejava bé i es deixava 1 minut, passat el qual es feren 4 lectures a intervals de 30 segons.

La lectura es feia en un espectrofotòmetre Shimadzu CL-720. L'aparell donava directament l'activitat GOT en UI/L.

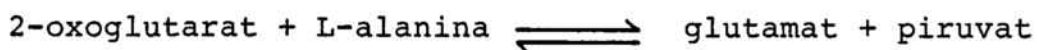
III.2.6.6. Determinació de l'alanina transaminasa (GPT).

Per a la determinació de l'activitat alanina transaminasa (E.C.2.6.1.2, GPT, glutamat-piruvat transaminasa) usàrem el mètode descrit per Henry i col. (1960) i comercialitzat en forma de kit per ITC diagnostics (Estats Units).

-Fonament

El mètode es basa en la disminució de l'absorbància a

340 nm que s'esdevé en oxidar-se el NADH a NAD^+ fruit de les següents reaccions acoblades



-Reactius: vial amb la següent composició

- L-alanina 178 mmols/l
- 2-oxoglutarat 10.7 mmols/l
- NADH 0.23 mmols/l
- lactat deshidrogenasa > 2600 μ /l
- tampó fosfat pH: 7.4, 52.2 mmols/l

el vial s'ha de reconstituir amb 16 ml d'aigua destil.lada.

-Procediment

La reacció es feia a 37°C per la qual cosa era necessari preescalfar el reactiu durant 2-3 minuts. Un cop assolida la temperatura es barrejaven 3 ml del reactiu amb un volum determinat d'eritròcits lisats, dependent de l'hematòcrit, ó 200 μ l de plasma. Es deixava reposar durant 1 minut i passat aquest es feien 4 lectures d'absorbència a intervals de 1 minut.

La lectura es feia en un espectrofotòmetre Shimadzu CL-720, el qual donava directament l'activitat GPT en UI/L.

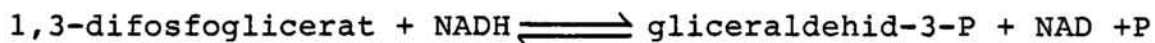
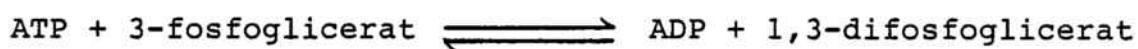
III.2.6.7. Mesura de la concentració d'ATP intracel.lular.

Per a la mesura de la concentració d'ATP, s'ha usat un mètode enzimàtic espectrofotomètric descrit per Bucker

(1947), modificat posteriorment per Adams (1963) i comercialitzat per Sigma en forma de kit.

-Fonament

El mètode es basa en la mesura a 340 nm de la disminució d'absorbància produïda per la oxidació del NADH a NAD⁺ degut a les següents reaccions acoblades



essent PGK: fosfoglicerat fosfoquinasa

GADP: gliceraldehid fosfat deshidrogenasa

-Reactius

-NADH 0.3 mg en 3 ml finals

-Solució tamponadora de PGA 18 mmols/l. Conté ions magnesi i EDTA. Preservat amb cloroform.

-Barreja de GADP/PGK. Suspensió en sulfat amònic de GADP (múscul de conill) 800 µ/ml i de PGK (llevat) 450 µ/ml

-àcid tricloracètic 12% (w/v)

-Procediment

Es partí d'una suspensió d'eritròcits (aproximadament 500 µl) d'hematòcrit conegut (aproximadament 20-30%). Un cop compactades les cèl.lules per centrifugació 20 s 15000xg (Sigma 101M) s'extragué el sobrenadant i s'hemolitzaren les cèl.lules amb l'adició de 1 ml d'àcid tricloracètic (12%). Es barrejà bé i es deixà durant 5 minuts en un bany de gel.

Passat aquest temps es centrifugà a 3000 rpm durant 10 minuts (en fred) i seguidament es separà el sobrenadant lliure de proteïnes.

A 1 ml de la solució tamponadora de PGA s'afegí 1.5 ml d'aigua desionitzada, 0.5 ml del sobrenadant i 0.3 mg de NADH. Es barrejà per inversió repetides vegades per a dissoldre el NADH i s'agafaren 2 ml d'aquesta mescla per a la valoració, els quals es posaren en una cubeta de lectura espectrofotomètrica (Phillips) i es feu una prelectura a 340 nm. Seguidament s'hi afegí 40 µl de la barreja d'enzims, es barrejà per inversió, i quan la lectura s'estabilitzà (aproximadament 10 minuts) es feu la segona lectura, obtenint, per resta, la disminució d'absorbància.

El resultat s'expressa en µmols/l AIC. Aquesta mesura dels nivells d'ATP es realitzà en eritròcits immediàtament després de l'extracció de sang, després de l'últim rentat segons les condicions descrites en l'apartat III.2.3, després de 1 hora d'incubació d'aquestes cèl.lules a 37 C i al cap de 2 hores d'incubació.

III.2.7. Mesura del transport d'aminoàcids.

Per a la mesura del transport d'aminoàcids en eritròcits s'ha usat un mètode àmpliament descrit a la bibliografia (per exemple, Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col, 1983) com és el radioquimic, que es basa en l'anàlisi radioactiva de lisats de cèl.lules després d'haver-les incubat, sota diferents condicions de temps i medis, en presència de diferents aminoàcids marcats radioactivament i d'activitats específiques finals diferents.

Els aminoàcids analitzats han estat: L-alanina,

glicina, L-leucina, L-glutamat, L-glutamina, L-prolina i L-lisina.

III.2.7.1. Captació en funció del temps (overshoot).

L'estudi de la captació d'aminoàcids en funció del temps ens dóna informació sobre dues característiques bàsiques del transport: una és si el transport per a un aminoàcid determinat és, ó no, dependent de Na^+ . La segona ens informa de si l'eritròcit és capaç d'acumular aquest aminoàcid per sobre de la concentració en el medi (overshoot). Per altra banda, l'estudi en funció del temps també ens dóna el temps en que s'haurà d'estudiar la cinètica del transport: serà aquell temps en que la velocitat és linial amb el temps, assimilant-ho al concepte de velocitat inicial de la cinètica enzimàtica.

III.2.7.1.1. Medis d'incubació.

- tampó HEPES, pH: 7.4 a 37 C, 150 mM (Sigma)
- MgSO_4 (Merck) 20 mM
- glucosa (Carlo Erba) 50 mM
- albúmina (fracció V Sigma) 1%
- NaCl (Merck) 1400 mM
- KCl (Merck) 50 mM
- KCl (Merck) 1450 mM
- aminoàcid corresponent, la concentració i marcatge del qual s'indica en la gràfica corresponent.

Aquestes eren les concentracions mares, les quals ens servien per a preparar els medis d'incubació, per barreja d'aquestes solucions, quedant 10 vegades més diluïts.

De medis d'incubació n'hi havia de dos tipus que anomenarem medi Na^+ i medi K^+ , que ací donem en la seva

concentració final:

Medi Na⁺

-tampó HEPES 15 mM
pH: 7.4 a 37°C
-MgSO₄ 2 mM
-glucosa 5 mM
-albúmina 0.1%
-NaCl 140mM
-KCl 5 mM
-aminoàcid

Medi K⁺

-tampó HEPES 15 mM
pH: 7.4 a 37°C
-MgSO₄ 2mM
-glucosa 5 mM
-albúmina 0.1%
-KCl 145 mM
-aminoàcid

III.2.7.1.2. Incubació

Per a la incubació dels eritròcits hem seguit bàsicament protocols descrits en la bibliografia (per exemple, Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col., 1983).

El protocol d'obtenció de les cèl.lules és el descrit en els apartats III.2.2 i III.2.3, amb els quals s'obtenien eritròcits nets i buits d'aminoàcids, essent el medi que utilitzàvem en el rentat, el que ací anomenem medi K⁺. En acabar el tercer i últim rentat, es feia la resuspensió de la meitat dels eritròcits en medi Na⁺, i l'altra meitat en medi K⁺, ajustant l'hematòcrit en ambdós casos a un 20-30%.

La raó per la qual tot el procés de rentat i buidament d'aminoàcids dels eritròcits es fés en medi K⁺, i el medi Na⁺ només s'utilitzés immediatament abans de la incubació, és que el transport, quan és dependent de sodi i acumulatiu, depèn del gradient electroquímic generat per la diferent concentració d'ions a dins i fora de la cèl.lula. En rentar les cèl.lules només en medi K⁺ aconseguim que aquestes

s'equilibrin amb el K^+ , el qual entra a la cèl.lula per difusió, i estiguin buides de Na^+ , el qual surt de la cèl.lula per difusió. D'aquesta manera, en iniciar la incubació establirem el màxim gradient electroquímic, ja que hi posavem el medi Na^+ , i així la cèl.lula era pobra en Na^+ i rica en K^+ en un medi ric en Na^+ i pobre en K^+ .

Un cop resuspesos els eritròcits en medi Na^+ i en medi K^+ es podia començar la incubació:

Es preparaven els medis amb l'aminoàcid apropiat a una concentració, generalment, de 0.2 mM i l'aminoàcid radioactiu (0.5-2 μ Ci/ml, dependent, entre altres coses, de si el marcatge era ^{14}C ó 3H). Es preparaven 2.5 ml de cada medi (Na^+ i K^+) tot per duplicat (és a dir que les incubacions eren de 4 sèries: 2 sodi i 2 potassi). Un cop preparats els medis, es preescalfaven a $37^\circ C$ en un bany d'incubació termostatitzat i un cop assolida la temperatura s'hi afegia 500 μ l de la suspensió d'eritròcits, en el seu medi corresponent, resultant, doncs, en una concentració final de cèl.lules del 3-5%. A temps adequat (generalment entre 30 s i 3 hores) s'aturava el transport i es mesurava la radioactivitat de dins les cèl.lules.

-Parada del transport.

Un dels principals problemes pràctics en la mesura del transport en eritròcits ha esdevingut l'aturada del transport a un temps determinat, i l'evitar el medi atrapat quan s'ha de lisar les cèl.lules per a mesurar la radioactivitat dins dels eritròcits, ja que hem de tenir en compte que en el medi sempre hi ha molta més radioactivitat que dins les cèl.lules (d'altra manera no podríem pas mesurar el transport real), i que un dels protocols més emprats per altres tipus de cèl.lules, com és la filtració,

s'ha comprovat que no és recomanable en eritròcits degut a que es trenquen fàcilment (Al-Saleh i Wheeler, 1982).

Hi ha dos mètodes predominants, amb més o menys variacions, en la bibliografia. Els dos són similars, però tenen diferències importants. Nosaltres fem servir els dos, inicialment, per a comparar-los.

El primer mètode consisteix en extreure 200 µl de la incubació en el temps que es vulgui aturar el transport, i posar-los en tubs Eppendorff en els que s'hi havia posat prèviament 1 ml del medi K^+ fred (és important que estiguin a baixa temperatura). Immediàtament es procedeix a centrifugar-los a 15000xg durant 20 s. Seguidament, s'extreia el sobrenadant amb l'ajut d'una pipeta pasteur connectada a una bomba de buit, anant amb molta cura de no emportar-se cèl.lules. Es resuspenia les cèl.lules compactades amb 1 ml del medi K^+ fred i es repetia tot el procés 4 vegades. Amb aquest protocol s'aconseguia tenir un precipitat cel.lular amb, òbviament, una certa quantitat de medi atrapat, però aquest tenia molt poca radioactivitat degut als 4 rentats realitzats.

El segon mètode consisteix en posar el 200 µl provinents de la incubació en tubs Eppendorf on prèviament s'hi havia posat 0.5 ml de dibutilaftalat (Merck) i a sobre d'aquest 0.8 ml de medi K^+ fred, de forma que quedessin dues capes ben definides (de vegades amb l'ajut d'una lleugera centrifugació). El dibutilaftalat és un oli que té més densitat que l'aigua però menys que les cèl.lules de forma que en centrifugar aquest tub on s'hi havia col.locat els 200 µl de la suspensió d'eritròcits incubats, les cèl.lules passaven a través de la capa de dibutilaftalat mentre que el medi quedava a sobre. Tot el procés es realitzava en fred. Un cop centrifugat (15000xg, 20 s), s'extreia el

sobrenadant, deixant una petita capa de dibutilaftalat per sobre les cèl.lules, i s'assecaven bé les parets del tub per evitar que quedés alguna gota de medi d'alta radioactivitat. Aquest segon mètode és el que fem servir per a totes les mesures de transport, en donar resultats molt similars i presentar els següents avantatges:

El mètode del dibutilaftalat es més segur i senzill ja que amb una sola centrifugació és suficient, i no és necessari resuspendre en cap cas les cèl.lules. D'aquesta forma s'evita la possibilitat certa d'augmentar l'hemòlisi en resuspendre les cèl.lules 4 cops, i es guanya temps (un sol pas contra 4). Per altra banda, hem comprovat que la radioactivitat atrapada entre les cèl.lules és molt més constant que en el primer mètode, de forma que es podia calcular com una constant a aplicar en els càlculs i no haver-la de calcular per a cada mostra. I, finalment, un avantatge també important és que, en no poder-se mesclar el dibutilaftalat amb aigua, podem deixar una capa d'aquest oli sobre les cèl.lules en l'extracció del sobrenadant, garantint que no ens emportéssim cèl.lules en aspirar el sobrenadant.

-Hemòlisi i desproteïnitació.

Un cop teniem les cèl.lules compactades i havent extret el sobrenadant, per a mesurar la radioactivitat incorporada s'havien d'hemolitzar i desproteïnitzar les cèl.lules. L'hemòlisi la feiem afegint-hi a les cèl.lules compactades 200 µl d'una solució al 0.1 % de Tritó X-100 en aigua destil.lada. Aquest detergent facilita el trencament de les membranes, sobretot quan es tenen les cèl.lules compactades com les teniem nosaltres. Un cop hemolitzats els eritròcits es desproteïnitzava amb l'addició d'àcid perclòric al 5%, es barrejava fortament i es centrifugava durant 3 minuts a

10000xg. Finalment s'agafaven 300 µl del sobrenadant desproteïnit pel comptatge de radioactivitat.

-Aminoàcids radioactius

S'usaren aminoàcids marcats en ^3H ó en ^{14}C d'alta activitat específica (Amersham, Regne Unit):

- L-(U- ^{14}C) Alanina	6.44 GBq/mmol	1.85 MBq/ml
- (U- ^{14}C) Glicina	4.18 GBq/mmol	1.85 MBq/ml
- L-(U- ^{14}C) Leucina	12.90 GBq/mmol	1.85 MBq/ml
- L-(U- ^{14}C) Glutamat	10.73 GBq/mmol	1.85 MBq/ml
- L-(U- ^{14}C) Glutamina	10.66 GBq/mmol	1.85 MBq/ml
- L-(2,3(n)- ^3H) Prolina	1.92 TBq/mmol	37.00 MBq/ml
- L-(4,5- ^3H) Lisina	1.48 TBq/mmol	37.00 MBq/ml

III.2.7.1.3. Mesura del blanc.

Com ja hem comentat en l'apartat anterior l'ús del mètode del dibutilaftalat per aturar la captació ens permeté considerar la radioactivitat mesurada com interna de l'eritròcit però que provenia en realitat del medi atrapat, com únicament dependent de, i proporcional a, la radioactivitat en el medi. D'aquesta forma poguèrem calcular el factor que, multiplicat per la radioactivitat del medi, ens donava la quantitat de radioactivitat que havíem de restar de la mesura feta en eritròcits.

Aquest experiment el realitzàrem amb sacarosa ^{14}C (Amersham, Regne Unit) d'alta activitat específica. El procediment fou el descrit en l'apartat III.2.7.1.2, utilitzant el mètode del dibutilaftalat. Coneguda la radioactivitat del medi i la del lisat cel.lular, i donat que la sacarosa no és captada pels eritròcits (Al-Saleh i Wheeler, 1982 per exemple), ens fou possible calcular el

valor de 9.74×10^{-4} com a factor relatiu a la radioactivitat del medi per a les mesures del transport que aplicarem a cada incubació.

III.2.7.1.4. Prova de l'adsorció de membrana.

Malgrat que la bibliografia mostri que en els estudis de captació d'aminoàcids per eritròcits no hi ha adsorció en membrana (Al-Saleh i Wheeler, 1982), nosaltres creïrem necessari comprovar-ho en les nostres condicions experimentals.

S'ha de tenir en compte que en estudiar la captació en eritròcits per mesures de la radioactivitat d'un lisat cel.lular, d'entrada és impossible discernir entre aquella radioactivitat que es trobava realment a dins la cèl.lula i aquella que estigués enganxada a la membrana (adsorció) per la part externa. Per a comprovar si realment hi havia adsorció o no fem el següent experiment:

S'incubaren eritròcits en les mateixes condicions que les descrites en l'apartat III.2.7.1.2 amb L-leucina, L-lisina i L-prolina. La diferència era que el desproteïnitjat dels hemolitzats es realitzà en presència i en absència de les membranes. Es a dir, un cop hemolitzades, unes mostres foren centrifugades a $15000 \times g$ 20 s i es desproteïnitjà només el sobrenadant lliure de membranes, mentre que altres mostres seguiren el protocol normal, és a dir que es desproteïnitjà l'hemolitzat total (amb membranes). S'hi hagués adsorció, aquesta ha d'ésser irreversible, i per tant, la radioactivitat obtinguda en absència de membranes hauria d'ésser més baixa que la obtinguda en el desproteïnitjat de l'hemolitzat total (amb membranes). Realitzarem la incubació a dos temps diferents: a 10 i a 30 segons per L-leucina i a 10 segons i 1 minut per L-lisina i

L-prolina

Donat, però, que el protocol que seguirem inclou l'ús de Tritó X-100 el qual és un detergent que afecta a la membrana, es pot pensar que hi podria haver un efecte d'aquest detergent desenganxant l'aminoàcid de la membrana, i per tant, emmascarant-nos l'adsorció en l'experiment anterior. Per a comprovar aquest punt es repetí l'experiment anterior, aquest cop només amb L-prolina, però realitzant l'hemòlisi amb i sense tritó X-100.

III.2.7.1.5. Comprovació del mètode.

Donat que el protocol que seguirem per a mesurar el transport l'havíem extret de diferents fonts bibliogràfiques, fent-hi petites modificacions, creièrem oportú realitzar una comprovació final de que el mètode que hem emprat donava valors comparables amb els bibliogràfics. Aquest experiment consistí en fer mesures de la captació d'alanina en eritròcits humans seguint el nostre protocol i els temps i les concentracions emprades per Young i col. (1983).

Els eritròcits humans els obtinguèrem de l'autor d'aquesta memòria per extracció de 10 ml de sang de la vena radial superficial del braç esquerre. La sang fou processada segons es descriu a l'apartat III.2.7. Els eritròcits foren incubats amb ^{14}C alanina a 37 C durant 30, 60, 120, 180 i 240 minuts. La concentració d'alanina fou de 0.25 mM.

III.2.7.2. Captació d'aminoàcids en funció de la concentració (Cinètica).

Per a estudiar la cinètica de la captació dels diferents aminoàcids escollírem un marge de concentracions

ampli, amb diferències segons l'aminoàcid, basant-nos en dades bibliogràfiques de les constants cinètiques d'aquests mateixos aminoàcids mesurades en eritròcits d'altres espècies, un cop escollit el temps d'incubació que, com ja hem comentat anteriorment (apartat III.2.7.1), ens ve donat pels experiments de captació en funció del temps.

-Procediment

El procés d'obtenció i neteja dels eritròcits i el buidament d'aminoàcids fou el descrit en l'apartat III.2.7.

Els medis d'incubació en la seva constitució foren els descrits en l'apartat III.2.7.1 i completats amb les concentracions adequades d'aminoàcids (especificades en les gràfiques corresponents). Aiximateix, els medis també contenien sacarosa (Merck) (concentració mare 0.4 M) per a mantenir la osmomolaritat del medi igual, independentment de la concentració d'aminoàcid que hi hagués. Els medis per a la incubació es preparaven de la següent manera:

Es preparava una barreja de les diferents solucions per a medi Na^+ i medi K^+ (quan l'experiment de l'overshoot havia demostrat dependència de sodi pel transport d'aquell aminoàcid) però sense afegir-hi ni aminoàcid no radioactiu ni aigua per a fer la dilució. A aquests medis preparats d'aquesta forma, s'hi afegia l'aminoàcid radioactiu (aproximadament 0.5-1 $\mu\text{Ci}/150 \mu\text{l}$). Seguidament, a una bateria de tubs Eppendorf, s'hi posaven 150 μl del medi Na^+ ó 125 del medi K^+ . S'hi afegia 25 μl de les solucions de diferents concentracions de l'aminoàcid a estudiar (10 vegades més concentrades que la concentració final), 25 μl de sacarosa a una concentració inversament proporcional a la de l'aminoàcid i es completava el volum fins a 250 μl amb aigua desionitzada. Aquests tubets eren preincubats a 37 C ó

a 20 C en el cas de la leucina). Passats uns 3-5 minuts, es començava la incubació afegint-hi 50 µl de la suspensió d'eritròcits adequada (Na^+ ó K^+ , hematòcrit d'aquesta suspensió:20-30 %). Passat el temps d'incubació (calculat de forma independent per a cada tub) s'extreien 200 µl de la incubació i es segueix el procés d'aturada, d'hemòlisi i de desproteïnitització descrits en l'apartat III.2.7.1.

III.2.7.2.1. Estudis d'inhibicions.

Per a estudiar l'efecte de la presència de diferents aminoàcids sobre el transport d'aminoàcids determinats seguirem el protocol descrit en l'apartat III.2.7.2, però afegint-hi l'aminoàcid inhibidor a una concentració final de 10 mM, exceptuant el glutamat que per problemes de dissolució s'emprà a una concentració de 3 mM. Els aminoàcids testats i les condicions en les que es realitzaren els estudis s'especifiquen en les taules corresponents.

III.2.7.2.2. Estudi de la dependència al Cl^- del transport de glicina.

Per a comprovar si realment hi havia dependència al Cl^- en el transport de glicina, estudiarem la captació d'aquest aminoàcid en un medi que contenia Cl^- (és a dir, l'emprat en tots els estudis de transport) i en medis en que s'havia substituït el Cl^- per ions formiat i acetat. En aquest experiment només s'estudià el transport total, en presència de sodi. Els eritròcits es netejaren, buidaren d'aminoàcids i incubaren en medi clorur, formiat ó acetat sòdics a una concentració final de 145 mM. La incubació es feu a 37 C durant 3 minuts, seguint el protocol descrit en l'apartat III.2.7.2.

III.2.7.3. Càlculs i expressió dels resultats.

Per arribar a una expressió del transport a partir de les dpm obtingudes del lisat cel.lular, hem seguit un procés de càlcul que per raons que se'ns escapen no l'hem vist usat en la bibliografia, però que considerem perfectament correcte i més senzill que alguns dels descrits.

Donat que hem comprovat que la mesura de l'hematòcrit és fiable i que el medi atrapat en les nostres condicions és negligible (apartat III.1.5) considerarem que podem, a partir del valor hematòcrit que s'obté en l'última resuspensió d'eritròcits abans de la incubació, arribar a saber l'hematòcrit en els 200 μ l que s'extreien de la incubació per a mesurar la radioactivitat incorporada en les cèl.lules. Aquest volum de cèl.lules, recordem-ho, no sofreix cap variació ja que és tot aquest volum el que s'hemolitza i es desproteïnitza, i el mètode del dibutilaftalat ens garanteix que en l'únic pas d'extracció del sobrenadant no perdiem cèl.lules.

Tenim, doncs, l'hematòcrit dels 200 μ l extrets. I, a més a més, hem calculat que la densitat de les cèl.lules es pot considerar 1. Amb aquestes consideracions, podem convertir el valor hematòcrit en mg de cèl.lules. Per tant, coneixent l'activitat específica per a cada aminoàcid emprat, podem expressar el transport tant per volum com per pes de cèl.lules (per exemple: nmols/l cèl. ó nmols/mg cèl.). Com que, per altra banda, també disposem del contingut d'aigua dels eritròcits (apartat III.1.7) podrem expressar el transport per mg d'aigua intracel.lular (AIC), que és com decidírem expressar els resultats de transport en aquesta memòria. Així, en els estudis de captació en funció de la concentració l'expressió escollida ha estat nmols d'aminoàcid captat/ml AIC/min. En els estudis de captació en

funció del temps, però, hem preferit expressar en les gràfiques la relació aminoàcid dins la cèl.lula/aminoàcid en el medi (relació IN/OUT), havent-la corregit pel contingut d'aigua cel.lular i del medi.

III.3. PART 3: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN RETICULÒCITS IN VITRO

III.3.1. Plantejament experimental.

En algunes espècies s'ha descrit que els reticulòcits presenten uns sistemes de transport en general més actius i més capaços que els que presenten els eritròcits. L'objectiu d'aquesta part és comprovar quina és la situació en la rata, és a dir, quines són les característiques del transport d'aminoàcids en la rata.

III.3.2. Obtenció de reticulòcits.

La bibliografia mostra dos mètodes diferents per a la obtenció d'alts nivells de reticulòcits circulants, mètodes emprats principalment en conill i be (Antonioli i Christensen, 1969; Tucker i Young, 1982 entre d'altres). Un d'ells es basa en l'administració de fenilhidracina, compost que destrueix els eritròcits, estimulant per tant la sortida de reticulòcits a la circulació. L'altre mètode es basa en extreure de l'animal una important quantitat de sang de forma repetida durant un període de temps adequat, causant per tant una forta anèmia a l'animal (per disminució dels eritròcits circulants), obligant a compensar aquesta pèrdua amb una elevada síntesi de reticulòcits.

III.3.2.1. Procediment.

Hem usat el segon mètode presentat en l'apartat anterior per evitar l'ús de la fenilhidracina, que en ser un tòxic que actua a nivell de les membranes és poc recomanable per a estudis de transport (Antonioli i Christensen, 1969; Tucker i Young, 1982).

Donat que l'aparició de reticulòcits a la circulació presenta la forma de pic i pràcticament dura només 1 dia (Antonioli i Christensen, 1969), i no havent-hi referències en la bibliografia de l'ús d'aquest mètode en la rata, el primer que calia fer era trobar les millors condicions per a assolir un pic clar de reticulòcits circulants. Per a aconseguir-ho seguirem dos protocols lleugerament diferents.

S'usaren rates en les mateixes condicions descrites en l'apartat III.1.2. Els animals foren lleugerament anestesiats amb éter i la sang s'extreïé per punció cardíaca.

A un grup de rates se'ls extreïé 3 ml de sang diaris, durant 3 dies. A un altre grup l'extracció fou de 3 ml de sang durant 4 dies. Cada dia es mesuraven l'hematòcrit (vegeu apartat III.1.5) i es feia un comptatge de reticulòcits per tinció supravital amb blau cresil brillant (Merck). Els resultats demostraren que el primer protocol era millor i fou així com es realitzà en endavant.

III.3.3. Diferents paràmetres estudiats en els reticulòcits

Tots els paràmetres mesurats en reticulòcits han estat prèviament descrits en eritròcits. Així es determinà l'hematòcrit (vegeu apartat III.1.5), contingut d'aigua intracel·lular (III.1.7), densitat de les cèl·lules (III.2.6.2), hemoglobina (III.2.6.3), activitat alanina transaminasa (III.2.6.6), activitat aspartat transaminasa (III.2.6.5) i nivells d'ATP intracel·lular (III.2.6.7).

III.3.4. Mesura del transport d'aminoàcids.

En general, en aquests tipus d'estudis, quan es parla de transport en reticulòcits acostuma a significar transport

en suspensions de cèl.lules sanguínes amb una certa riquesa en reticulòcits (20-80%) i es sol indicar per cada experiment concret el % de reticulòcits sobre el total de cèl.lules sanguínes presents en la suspensió. Això també ho hem aplicat nosaltres. Es a dir, que quan parlem del transport en reticulòcits ens referim a suspensions riques en aquestes cèl.lules, però no pures.

Per a estudiar el transport d'aminoàcids hem seguit el mateix protocol que per eritròcits, tant pel que fa la captació en funció del temps (apartat III.2.7.1) com al transport en funció de la concentració (III.2.7.2), com a l'efecte inhibitor de diferents aminoàcids (III.2.7.2.1) i a la dependència al Cl^- del transport de glicina.

Hem estudiat el transport de L-alanina, glicina, L-leucina, L-glutamina i L-glutamat amb els mateixos marcatges i activitats específiques detallades en l'apartat III.2.7.1.

III.3.4.1. Estudis de la influència del pH del medi sobre el transport de glutamina i alanina.

Per a estudiar com afectava el pH del medi al transport de glutamina i alanina s'utilitzaren medis d'incubació de diferents pH aconseguits amb l'ús de tampó Hepes ajustat a pH de 6.5, 7.4 i 8. Les cèl.lules foren obtingudes i processades com es descriu en l'apartat III.3.4, però des del primer rentat es dividiren en 3 grups un per cada pH i es processaven sempre amb el medi ajustat al seu pH corresponent fins al final de la incubació. L'estudi es feu tant en medi Na^+ com en medi K^+ descrits en l'apartat III.2.7.1.1)

III.4. PART 4. CONTRIBUTIÓ DELS RETICULÒCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS.

III.4.1. Plantejament experimental.

Un cop esbrinat quines són les característiques del transport d'aminoàcids representatius en suspensions riques en reticulòcits i demostrat que aquest transport és, per alguns aminoàcids, més ràpid i capaç que el descrit en eritròcits, ens plantejarem comprovar si aquest fet tenia algun reflex en la situació "in vivo". Es a dir, que si els sistemes de transport descrits "in vitro" són els responsables de, ó estan implicats en, la participació dels eritròcits en el transport d'aminoàcids entre els òrgans, aleshores, en una situació on hi hagi alts nivells de reticulòcits circulants podriem esperar una més alta contribució d'aquestes cèl.lules en el flux interòrgans d'aminoàcids, malgrat que la comparació no es pugui fer tan directa en haver-hi diferències intrínseques a les dues situacions.

III.4.2. Procediment.

La obtenció d'alts nivells de reticulòcits circulants ha estat descrita en l'apartat III.3.2.1.

La obtenció de mostres sanguínies s'ha realitzat segons el descrit en l'apartat III.1.3, però només s'ha analitzat els balanços intestinal, hepàtic i esplàncnic, és a dir que només s'ha extret mostres sanguínies de la vena hepàtica, la vena porta i l'artèria aorta.

La obtenció de plasma ha estat descrita en l'apartat III.1.4. i la mesura de l'hematòcrit en el III.1.5. La mesura dels aminoàcids lliures s'ha realitzat segons es

descriu en l'apartat III.1.6 i la mesura de l'aigua intracel.lular i plasmàtica segons l'apartat III.1.7. Finalment s'ha comprovat l'estat dels animals mesurant el pH, pO_2 i pCO_2 sanguinis (apartat III.1.8).

III.5. COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT.

III.5.1. Aspectes generals.

La radioactivitat de les mostres es mesurà en un comptador d'escintil·lació líquida marca Packard, tipus TriCarb model 460C.

III.5.2. Líquid d'escintil·lació.

El líquid d'escintil·lació emprat fou una barreja dels següents compostos per litre de solució (Turner, 1971):

- 750 ml de xilé (Carlo Erba).
- 3 g de P.P.O. (2,5 difeniloxazol) (Koch-Light Lab).
- 100 mg de P.O.P.O.P. (1,4-bis (2-(5-feniloxazil)benzé)) (Sigma).
- 250 ml de tritó X-100 (Aldabó i Julià).

Aquest líquid d'escintil·lació es preparà dissolvent primer el PPO i el POPOP en xilé, per agitació. Després, s'afageix el tritó X-100 i s'agita fins que s'ahgi barrejat del tot. Es manté sempre en ampolla fosca per evitar la seva descomposició per la llum. Aquest líquid permet el comptatge de mostres liposolubles així com també d'hidrosolubles sempre i quant, en aquest darrer cas, es mantinguin proporcions de volums de mostra i líquid d'escintil·lació que facin possible l'acció del tritó X-100 com a detergent.

III.5.3. Càlcul de les dpm.

El copmtador determina per a cada mostra un valor de radioactivitat que ve expressat en comptes per minut (cpm) que corresponen a la radioactivitat present, així com també a les condicions particulars de cada vial que conté

radioactivitat. Existeix un emmascarament de les mostres que fa que hi hagi una pèrdua en la detecció de cpm a partir de les dpm originals i que és provocat per interferències en la producció i/o transmissió de l'energia llumínica dins del líquid d'escintil·lació.

Per a conèixer les dpm de radioactivitat a la mostra cal conèixer l'eficiència de cada comptatge. Això es fa mitjançant la determinació de les cpm a dos canals, A i B, de diferent rang d'energia, de forma que, per cada mostra, el comptador dóna un valor r que correspon a una relació entre els canals A i B front a una radiació gamma constant (estàndar externa). Per a conèixer l'eficiència de cada comptatge a partir de la relació de canals a l'estàndar externa es contrueixen periòdicament per a cada isòtop una corba d'eficiència.

III.5.4. Corba d'eficiència per a ^{14}C .

Per a construir la corba d'eficiència de ^{14}C es partí d'una patró de vials contenint tolué- ^{14}C amb dpm conegudes (51000) i iguals per a cada vial però amb diferent grau d'emmascarament, degut a la presència de concentracions creixents d'un agent emmascarador, en aquest cas cloroform (New England Nuclear, NES-202). Aquests vials es comptaren varies vegades obtenint-se corbes d'eficiència E (relació entre les cpm detectades i les dpm originalment presents) respecte a la relació de canals r de les comptes detectades a un canal respecte a l'altre. A partir de les cpm i de la r de cada vial comptat es determinà sobre la corba l'eficiència de cada mostra, i així es calculà :

$$\text{dpm} = \text{cpm} / E$$

III.5.5. Corba d'eficiència per ^3H .

Pel comptatge i determinació de dpm de ^3H es procedí en tot igualment com s'ha descrit pel cas del ^{14}C . En aquesta situació les corbes d'eficiència per l'isòtop ^3H es determinaren a partir d'una patró d'hexadecà- ^3H .

III.6. ESTADÍSTICA.

Totes les dades es presenten com a mitjanes i l'error estàndar de les mitjanes.

Les comparacions entre mitjanes s'han realitzat aplicant el mètode de la t de Student amb la qual, mitjançant unes taules, s'obté la probabilitat de que les diferències observades siguin degudes a l'atzar.

En els casos en que s'ha comparat una mitjana amb un número constant (0 ó 1), s'ha aplicat un cas especial de la t de Student, fent:

$$t = X / E.S.$$

essent X: mitjana de les mostres

E.S.: l'error estàndar de la mitjana

i comprovant-se que aquest cocient segueix una distribució normal. El resultat d'aquest cocient es comparava amb la taula de la t de Student per $n-1$ graus de llibertat (essent n el nombre de dades).

IV. RESULTATS

IV.1. PART 1: CONTRIBUCIÓ DELS ERITRÒCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS.

IV.1.1. Paràmetres hemàtics i fluxos sanguinis.

En la taula IV.1.1 es mostren una sèrie de paràmetres hemàtics i les activitats dels enzims alanina transaminasa i aspartat transaminasa de sang i cèl.lules sanguines corresponents a rates femelles verges i adultes d'un pes aproximat de 220-250 grams, a l'inici de la fase lumínica.

El pH i les pressions parcials d'oxigen i d'anhidrid carbònic de l'artèria aorta i de les diferents venes es mostren en la taula IV.1.2. Com es pot observar, el pH sanguini és pràcticament el mateix independentment del lloc d'on s'hagi extret la mostra. La pressió parcial d'oxigen és més alta en l'artèria que en les venes, tenint aquestes la meitat del valor arterial, essent la més baixa la vena hepàtica. La pressió parcial d'anhidrid carbònic presenta els valors més baixos en l'artèria, essent els més alts els corresponents a la vena porta, és a dir, a la vena que irriga l'intestí principalment.

La taula IV.1.3. mostra els valors del flux sanguini expressat en ml/min. de les diferents venes. Com es pot observar, la vena hepàtica és la que presenta un flux sanguini més alt, seguida de la vena porta que representa un 66% del flux total hepàtic. L'artèria hepàtica, per tant, contribueix amb un 34% al flux hepàtic. La vena renal, la jugular i la vena il.líaca tenen un flux sanguini molt similar entre 5 i 6 ml/min.

TAULA IV.1.1. PARAMÈTRES HEMÀTICS I ACTIVITAT GOT I GPT EN CÈL.LULES DE SANG NORMAL.

Densitat cèl.	1.03±0.01
% Aigua cèl.	61.05±0.14
Cèl.x10 ⁶ /mm ³	7.51±0.12
Hct %	42.65±0.47
% Reticulocits	2.05±0.03
Hb g/100 ml sang	12.89±0.22
CHCM %	30.26±0.56
VCM u ³	56.94±0.90
HCM pg/cèl.	17.21±0.96
GOT UI/L cèl.	1758±88
GPT UI/L cèl.	1159±53

essent Hb: hemoglobina

CHCM: contingut d'hemoglobina corpuscular mitja

VCM: volum corpuscular mitjà

HCM: hemoglobina corpuscular mitjana

TAULA IV.1.2. pH, pO₂ I pCO₂ EN L'ARTÈRIA I LES DIFERENTS VENES DE RATES NORMALS.

	pH	pO ₂	pCO ₂
A. Aorta	7.35±0.03	104.0±3.56	26.67±3.13
V. Jugular	7.31±0.02	68.4±2.42	48.67±2.17
V. Renal	7.33±0.02	66.5±1.92	37.50±7.50
V. Il.liaca	7.34±0.02	71.8±3.77	42.67±3.28
V. Hepàtica	7.34±0.04	53.0±1.47	45.17±4.97
V. Porta	7.31±0.02	62.2±4.63	51.50±2.00

TAULA IV.1.3. FLUXOS SANGUINIS DE LES DIFERENTS VENES DE RATES NORMALS.

	<u>ml/min</u>
V. Hepàtica	21.62±0.27
V. Porta	14.29±0.34
A. Hepàtica	7.33±0.17
V. Renal	5.50±0.37
V. Jugular	5.75±0.63
V. Il.líaca	5.30±0.30

IV.1.2. Concentració d'aminoàcids en l'artèria: sang i compartimentació sanguinial.

En la taula IV.1.4 es mostra la concentració d'aminoàcids en sang i en les dues fraccions sanguines corresponents a mostres arterials i expressades en umols per litre de sang. Per la treonina, serina, glutamina, glicina, citrul.lina, tirosina, histidina i lisina no hi ha diferències significatives entre els dos compartiments sanguinis. Per la taurina, aspartat, asparagina, glutamat i arginina la fracció corpuscular de la sang és significativament més important quant la concentració total sanguinial que la fracció plasmàtica., mentre que per prolina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina i fenilalanina la situació és inversa, és a dir que la fracció plasmàtica de la sang té una contribució més important que la fracció corpuscular.

En la taula IV.1.5 es mostra la concentració d'aminoàcids en les cèl.lules sanguines, majoritàriament eritròcits, i en el plasma havent estat corregit aquest valor pel seu contingut d'aigua i per tant els resultats estan expressats en umols per litre d'aigua. Aixímateix, també es mostra en aquesta taula la relació de concentracions eritròcits/plasma. Com es pot observar, la metionina és l'únic aminoàcid que presenta una relació de concentracions no significativament diferent de 1. Tots els altres aminoàcids presenten una concentració en els eritròcits superior a la del plasma, destacant el glutamat i la taurina que es troben unes 9 vegades més concentrats en els eritròcits que en el plasma.

TAULA IV.1.4. CONCENTRACIÓ D'AMINOÀCIDS EN SANG I EN LES DUES FRACCIONS SANGUINIES DE RATES NORMALS.

Valors expressats en umols/l de sang. (promig de 30 animals)

<u>AMINOACID</u>	<u>SANG</u>	<u>FC</u>	<u>FP</u>	
TAU	362.3±20.0	294.9±17.6	75.5±5.2	***
ASP	39.2±2.9	25.9±2.8	13.3±0.8	***
THR	265.4±15.4	122.5±13.3	139.4±10.2	ns
SER	210.4±8.6	97.3±7.2	110.2±6.9	ns
ASN	56.0±8.6	32.3±4.6	20.7±1.9	*
GLU	231.5±12.9	172.3±15.6	39.8±3.3	***
GLN	546.1±50.3	198.9±22.4	235.2±14.8	ns
PRO	155.2±10.9	64.6±4.4	90.6±7.3	**
GLY	175.1±8.5	86.8±6.1	83.4±4.7	ns
ALA	389.6±21.1	165.9±21.0	218.0±12.3	*
CIT	92.7±4.5	41.2±4.7	51.6±2.0	ns
VAL	153.6±8.2	60.0±7.0	91.4±4.7	***
MET	29.0±3.9	9.3±3.8	30.2±2.2	***
ILE	84.7±5.2	35.4±3.8	48.2±2.7	**
LEU	142.5±8.9	57.5±5.9	82.8±5.0	**
TYR	46.6±2.7	21.1±2.1	25.0±1.4	ns
PHE	57.4±2.6	22.2±2.1	34.2±1.3	***
HIS	74.4±3.4	34.1±2.6	38.8±1.7	ns
TRP	22.9±1.5	-	46.2±2.0	-
LYS	445.8±31.6	235.9±24.7	233.7±15.1	ns
ARG	216.8±10.4	133.1±8.1	76.4±5.3	***

Estadística: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 respecte la fracció corpuscular de la sang.

TAULA IV.1.5. CONCENTRACIÓ D'AMINOÀCIDS EN ERITRÒCITS I PLASMA CORREGIT PEL CONTINGUT D'AIGUA I RELACIÓ DE CONCENTRACIONS.

Valors en uM. (promig de 30 animals).

<u>AMINOÀCID</u>	<u>ERITRÒCITS</u>	<u>PLASMA</u>	<u>E/P</u>
TAU	1161.3±69.2	139.6±9.6	8.32±0.57 ***
ASP	101.8±11.1	24.8±1.6	4.14±0.45 ***
THR	482.6±52.2	257.8±18.8	1.87±0.20 ***
SER	383.2±28.3	303.9±12.7	1.88±0.14 ***
ASN	127.2±18.0	38.4±3.5	3.32±0.47 ***
GLU	678.5±140.0	73.6±6.2	9.22±1.90 ***
GLN	783.6±88.2	435.3±27.5	1.80±0.20 ***
PRO	245.6±17.1	167.6±13.6	1.52±0.12 ***
GLY	341.8±23.9	154.4±8.7	2.21±0.15 ***
ALA	653.6±82.6	403.4±22.7	1.62±0.20 **
CIT	162.2±18.7	95.4±3.7	1.70±0.20 **
VAL	236.4±27.6	169.1±8.7	1.40±0.16 *
MET ⁻	36.5±15.0	55.9±4.0	0.65±0.26 ns
ILE	139.4±15.1	89.2±5.1	1.56±0.17 **
LEU	226.6±23.1	153.3±9.2	1.48±0.15 **
TYR	83.1±8.2	46.3±2.6	1.80±0.18 ***
PHE	87.5±8.2	63.3±2.4	1.38±0.13 **
HIS	134.2±10.3	71.7±3.1	1.87±0.14 ***
TRP	-	85.5±3.5	-
LYS	929.1±97.4	432.4±27.9	2.15±0.22 ***
ARG	524.1±31.7	141.4±9.7	3.71±0.26 ***

essent Tau: taurina

Cit: citrul.lina

Estadística: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 respecte a 1.

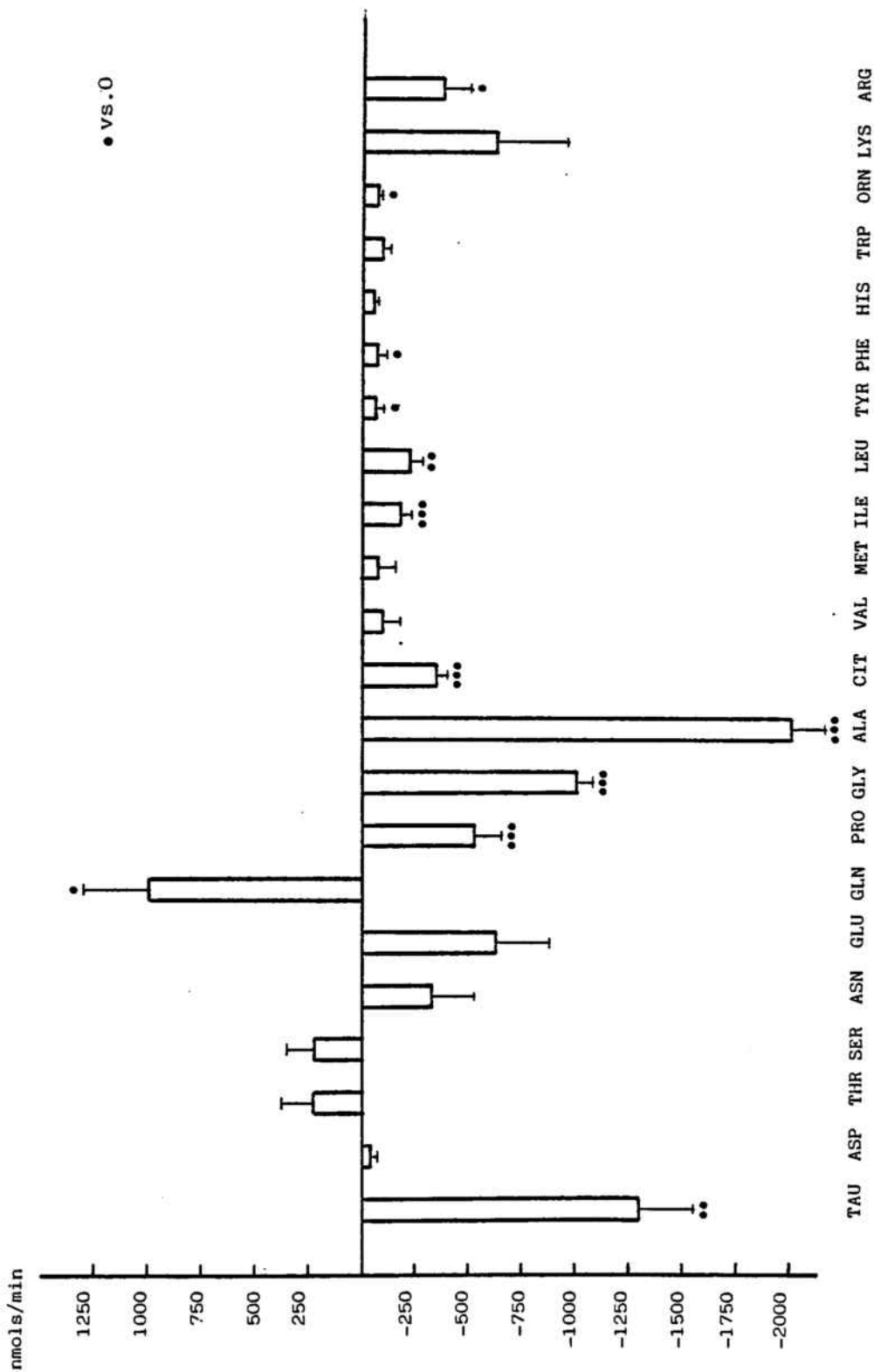


IV.1.3. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena porta.

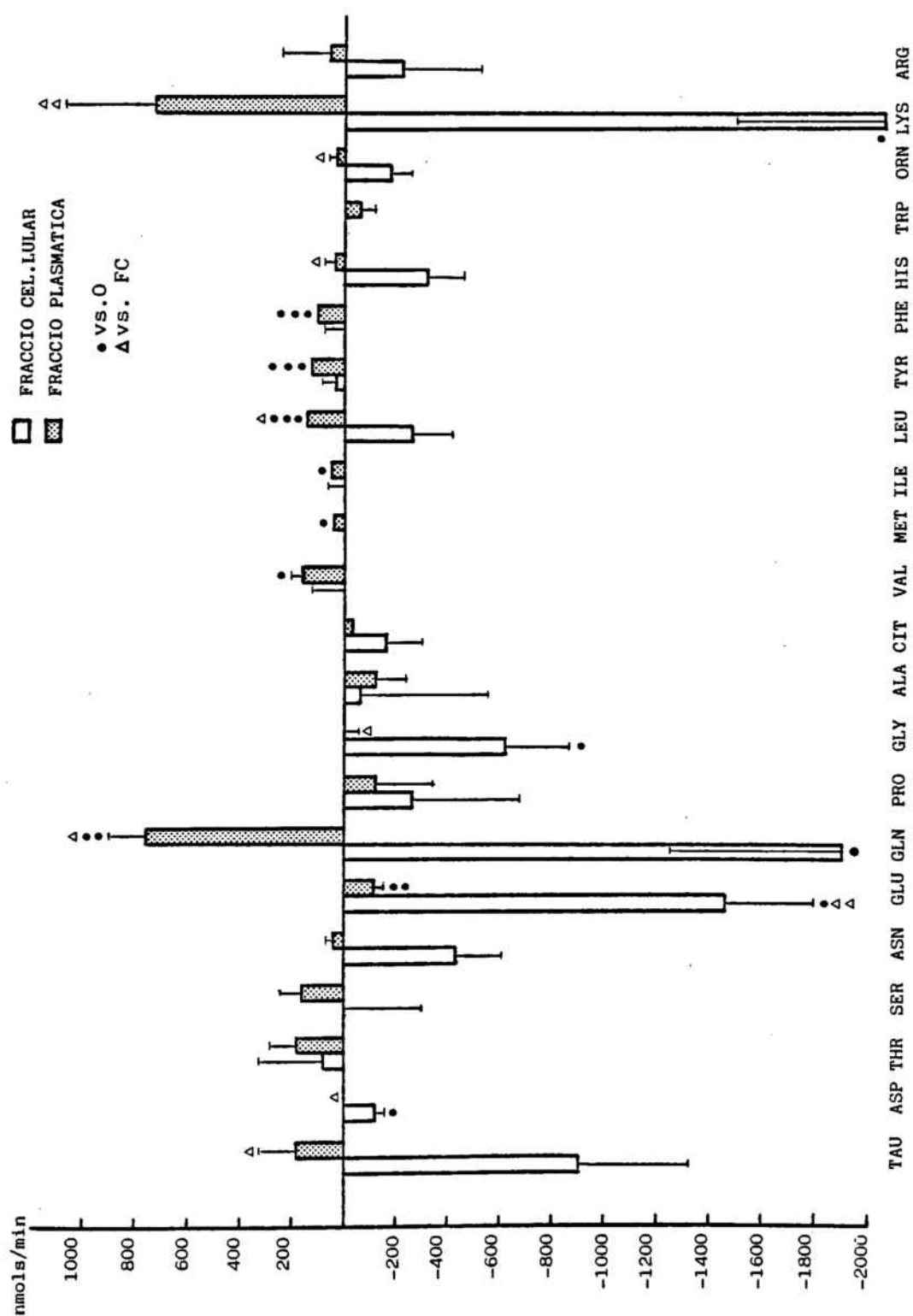
En la gràfica IV.1.1 es mostra el balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena porta, principalment intestí, mesurat en sang total i expressat en nmols/min.. Com es pot observar, aquests teixits alliberen de forma general aminoàcids a la circulació. Els aminoàcids alliberats en més gran quantitat són l'alanina, taurina, glicina i prolina principalment, sumant entre aquests aminoàcids al voltant del 80-90 % del total d'aminoàcids alliberats. Són també significatius els alliberaments de citrul.lina, arginina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina i ornitina, mentre que hi ha un balanç nul per l'aspartat, treonina, serina, asparagina, glutamat, valina, metionina, histidina, triptofan i lisina. La glutamina és l'únic aminoàcid que és captat de forma significativa de la sang per aquests teixits.

La contribució de les dues fraccions sanguinies al balanç d'aminoàcids pels teixits drenats per la vena porta es mostra en la gràfica IV.1.2. L'alliberament d'aminoàcids a la circulació mitjançant els eritròcits és significativa per la taurina, prolina, glicina, alanina, isoleucina, leucina, lisina i arginina, mentre que l'alliberament a la fracció plasmàtica de la sang és significativa per la taurina, aspartat, asparagina, prolina, glicina, alanina, citrul.lina i histidina. La captació de glutamina per aquests teixits es dóna únicament via plasma. La treonina, serina, valina, metionina, fenilalanina, triptofan i ornitina presenten un balanç nul a través d'aquests teixits per a les dues fraccions sanguinies. Per aspartat, asparagina, glutamina, citrul.lina, leucina, tirosina, lisina i arginina existeixen diferències significatives entre les dues fraccions sanguinies, però no s'observa cap

GRAFICA IV.1.1.1. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA PORTA.
 SANG TOTAL. (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



GRAFICA IV.1.1.6. BALANÇ ESPLANÇNIC D'AMINOACIDS. FRACCIONS SANGUINIES.
(ERITROCITS). (+) captació (-) alliberament.



cas en que hi hagi papers contraris estadísticament significatius pels dos compartiments de la sang.

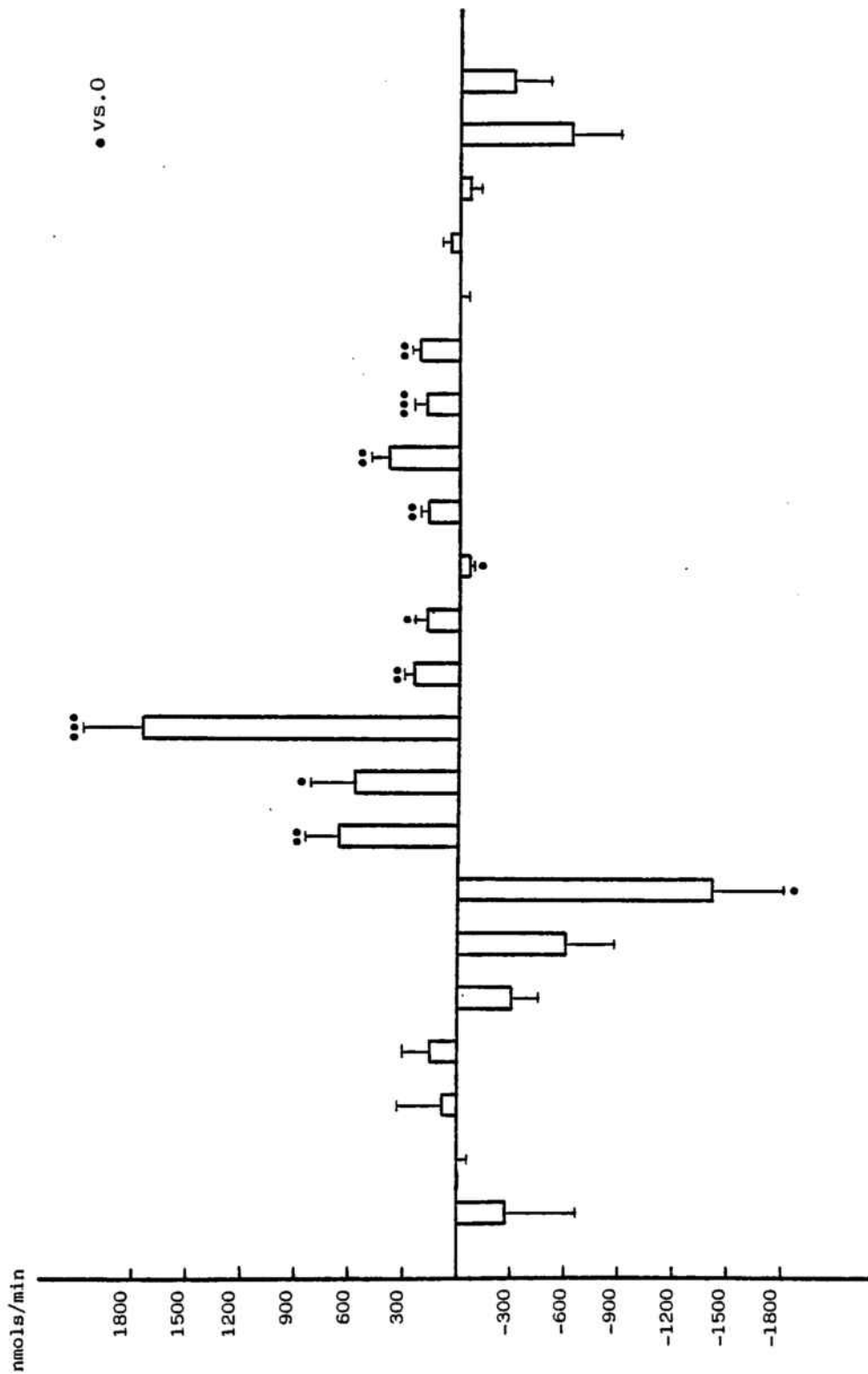
IV.1.4. Balanç hepàtic d'aminoàcids.

En la gràfica IV.1.3 es troba representat el balanç hepàtic d'aminoàcids en sang total. El fetge capta significativament prolina, glicina, alanina, citrul.lina, valina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina, mentre allibera de forma significativa glutamina i metionina. La taurina, aspartat, treonina, serina, asparagina, glutamat, histidina, triptofan, ornitina, lisina i arginina presenten un balanç hepàtic nul. Altre cop, els moviments d'alanina i de glutamina són quantitativament els més importants.

La contribució dels eritròcits i del plasma en el balanç hepàtic d'aminoàcids es mostra en la gràfica IV.1.4. Com es pot observar, el fetge capta aminoàcids majoritàriament de la fracció plasmàtica de la sang, essent significativa aquesta captació per la taurina, aspartat, asparagina, glicina, alanina, citrul.lina, valina, metionina, leucina, tirosina, fenilalanina i histidina. Per altra banda, els aminoàcids que són alliberats pel fetge, ho són principalment a la fracció corpuscular de la sang, essent aquest alliberament significatiu per la taurina, aspartat, asparagina, glutamina, ornitina i lisina.

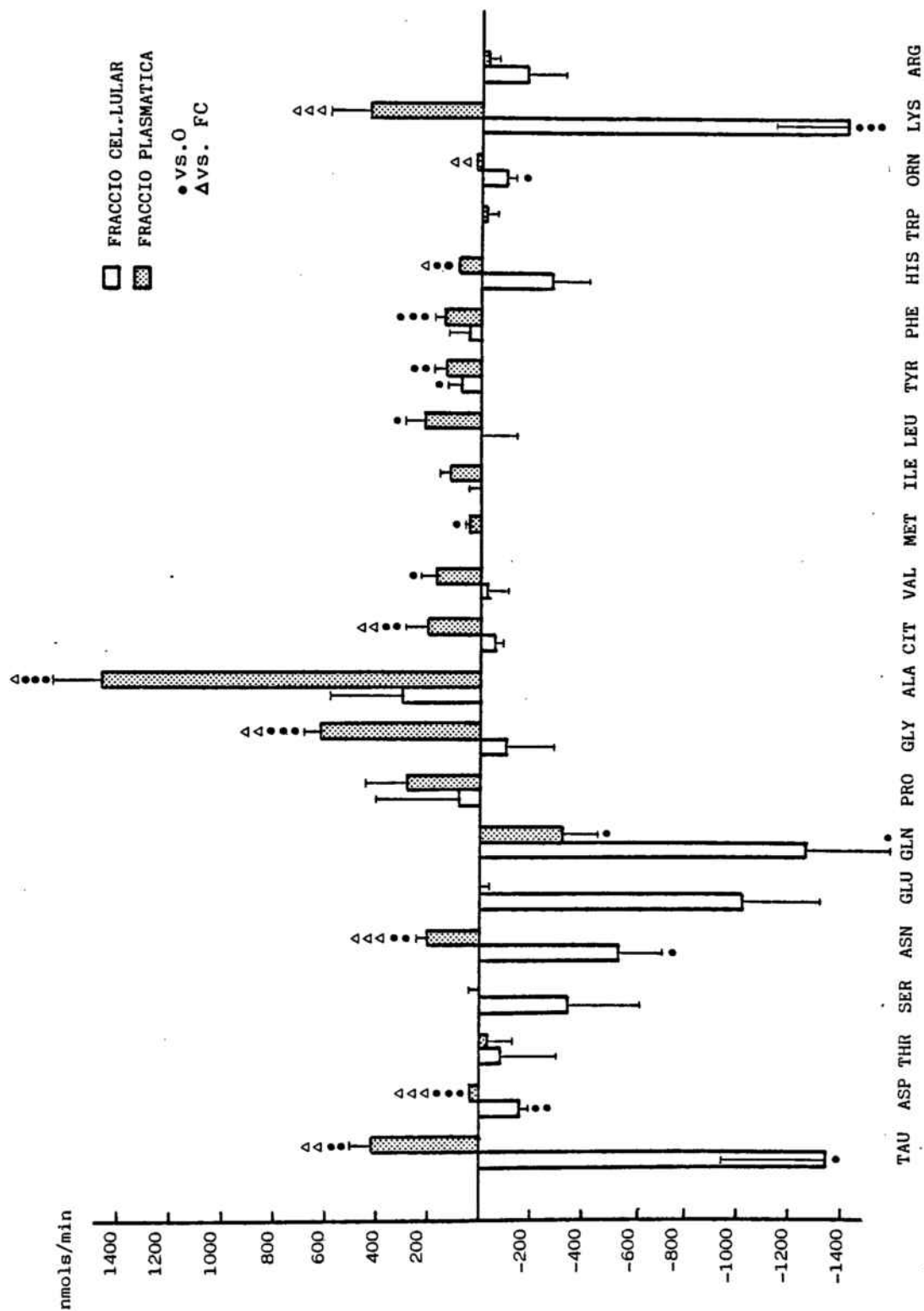
Per taurina, aspartat, asparagina, glicina, alanina, citrul.lina, histidina, ornitina i lisina existeixen diferències significatives entre els dos compartiments sanguinis, però només es veuen papers contraposats estadísticament significatius per la taurina, aspartat i asparagina.

GRAFICA IV.1.1.3. BALANÇ HEPATIC D'AMINOACIDS. SANG TOTAL. (ERITROCITS).
 (+)captació. (-) alliberament.



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.1.4. BALANÇ HEPATIC D'AMINOACIDS. FRACCIONS SANGUINIES.
(ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



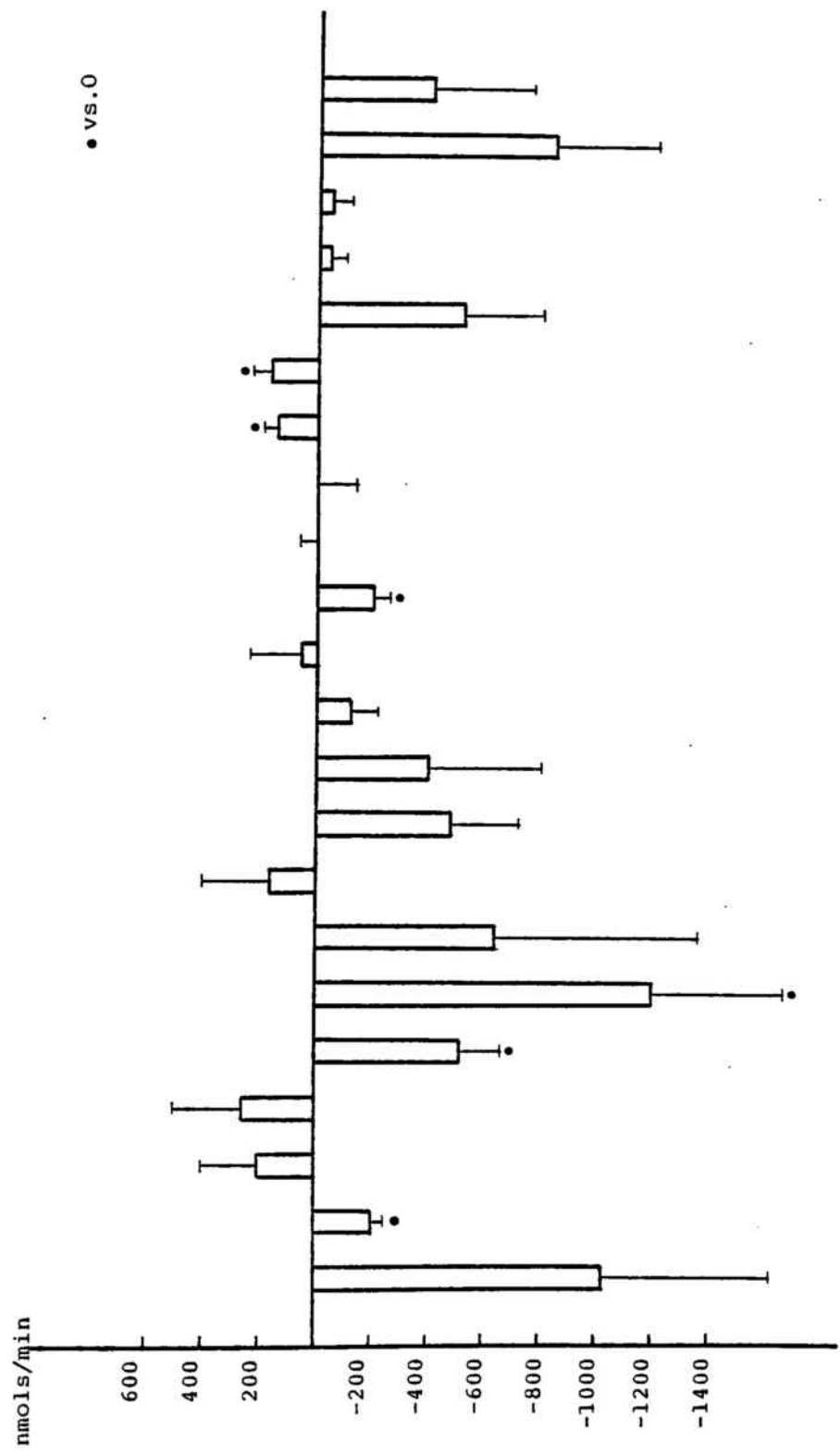
IV.1.5. Balanç esplàncnic d'aminoàcids.

En la gràfica IV.1.5. es mostra el balanç d'aminoàcids del llit esplàncnic mesurat en sang total. El llit esplàncnic presenta una tendència a exportar aminoàcids essent significativa per aspartat, asparagina, glutamat i metionina, mentre que presenta una captació significativa de tirosina i fenilalanina. La resta d'aminoàcids té un balanç esplàncnic nul: taurina, treonina, serina, glutamina, prolina, glicina, alanina, citrul.lina, valina, isoleucina, leucina, histidina, triptofan, ornitina, lisina i arginina.

La contribució de les dues fraccions sanguinies al balanç esplàncnic d'aminoàcids es mostra en la gràfica IV.1.6. Com es pot observar, existeix una clara tendència a que el llit esplàncnic capti aminoàcids de la fracció plasmàtica de la sang, essent significativa aquesta captació per glutamina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina, i n'alliberi a la fracció corpuscular de la sang, havent trobat significació estadística pels casos d' aspartat, glutamat, glutamina, glicina i lisina. Com a excepció es troba també un alliberament de glutamat a la fracció plasmàtica de la sang.

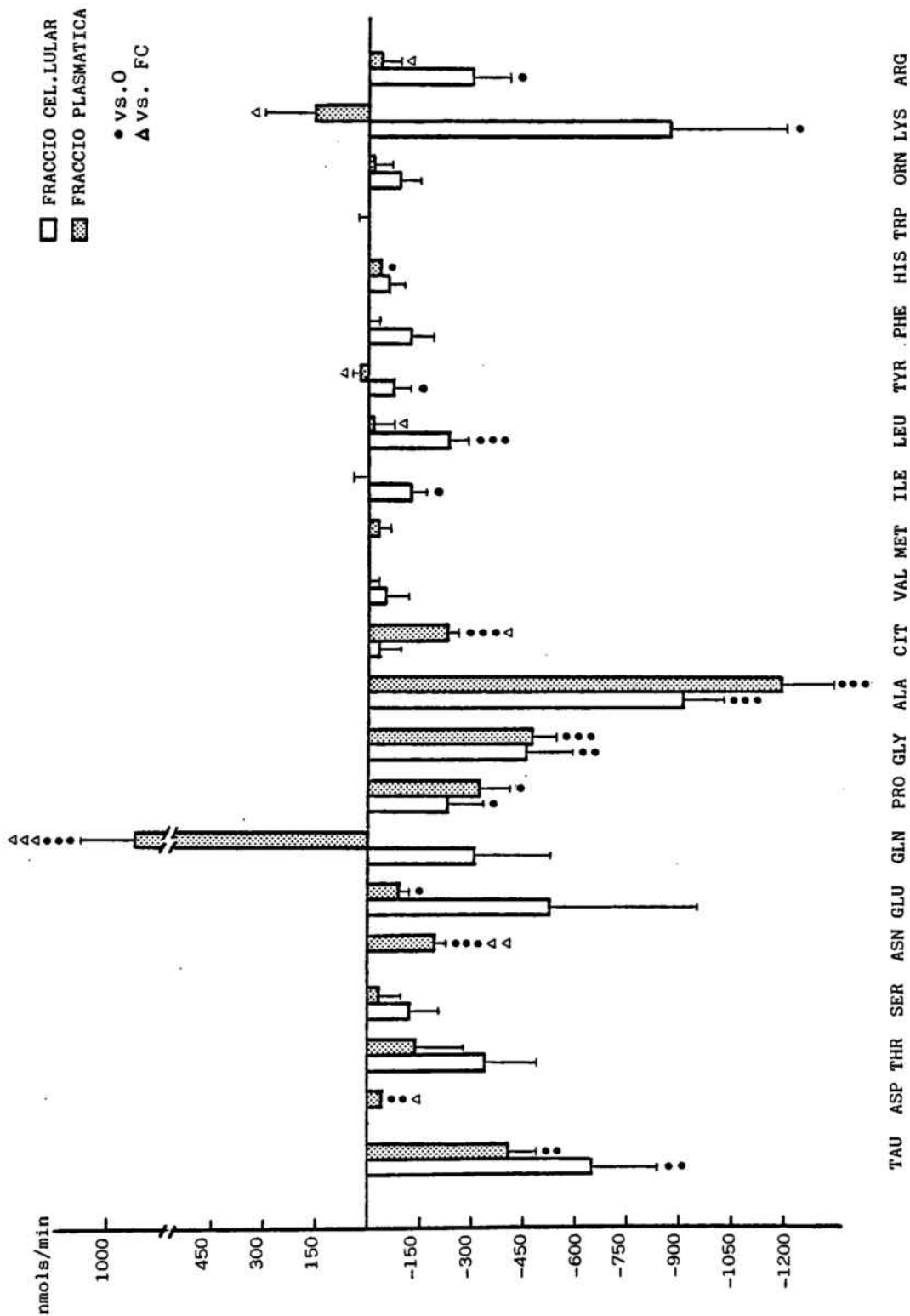
La glutamina és l'únic aminoàcid que presenta un comportament contraposat de les dues fraccions sanguinies: mentre que és alliberat a la fracció corpuscular, n'és captat de la fracció plasmàtica. No obstant, per taurina, aspartat, glutamat, glicina, leucina, histidina, ornitina i lisina, malgrat que els papers dels dos compartiments sanguinis no siguin contraposats si que són significativament diferents.

GRAFICA IV.1.5. BALANÇ ESPLANCNIC D'AMINOACIDS. SANG TOTAL. (ERITROCITS).
 (+) captació. (-) alliberament.



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.1.1.2 BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA PORTA.
 FRACCIONS SANGUINIES (ERITROCITS) (+) captació. (-) alliberament.



IV.1.6. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena il.líaca.

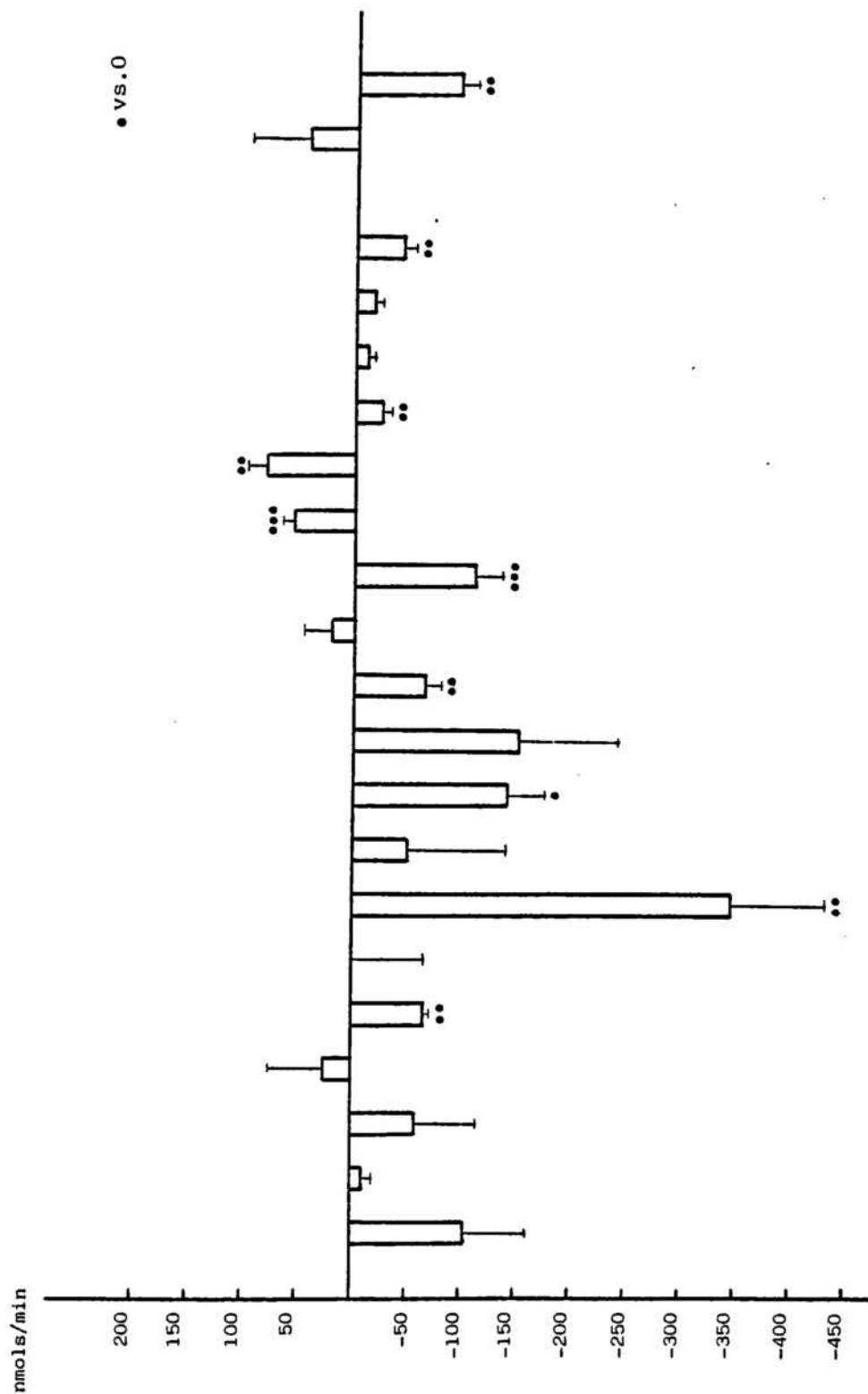
En la gràfica IV.1.7 es mostra el balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena il.líaca (principalment múscul) mesurat en sang total. Com es pot observar, aquests teixits presenten una clara tendència a exportar aminoàcids. Aquesta alliberació a la sang és significativa per asparagina, glutamina, glicina, citrul.lina, metionina, tirosina, triptofan i arginina. La tendència exportadora té les excepcions dels aminoàcids ramificats leucina i isoleucina els quals són captats significativament. Per taurina, aspartat, treonina, serina, glutamat, prolina, alanina, valina, fenilalanina, histidina, ornitina i lisina el balanç és nul.

La contribució de les dues fraccions sanguínies al balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena il.líaca es mostra en la gràfica IV.1.8. L'alliberament d'aminoàcids a la circulació es realitza a la fracció plasmàtica de la sang en els casos de la taurina, prolina i glicina, i a la fracció corpuscular en els casos de la citrul.lina, metionina i tirosina. Per altra banda, els teixits drenats per la vena il.líaca capten isoleucina de la fracció corpuscular de la sang i valina, isoleucina, i leucina de la fracció plasmàtica de la sang. No s'observa cap cas en que hi hagi comportament contraposat significatiu dels dos compartiments sanguinis però per glutamina, citrul.lina i metionina existeixen diferències significatives.

IV.1.7. Balanç renal d'aminoàcids.

En la gràfica IV.1.9 es mostra el balanç renal d'aminoàcids mesurat en sang total. Com es pot observar, el

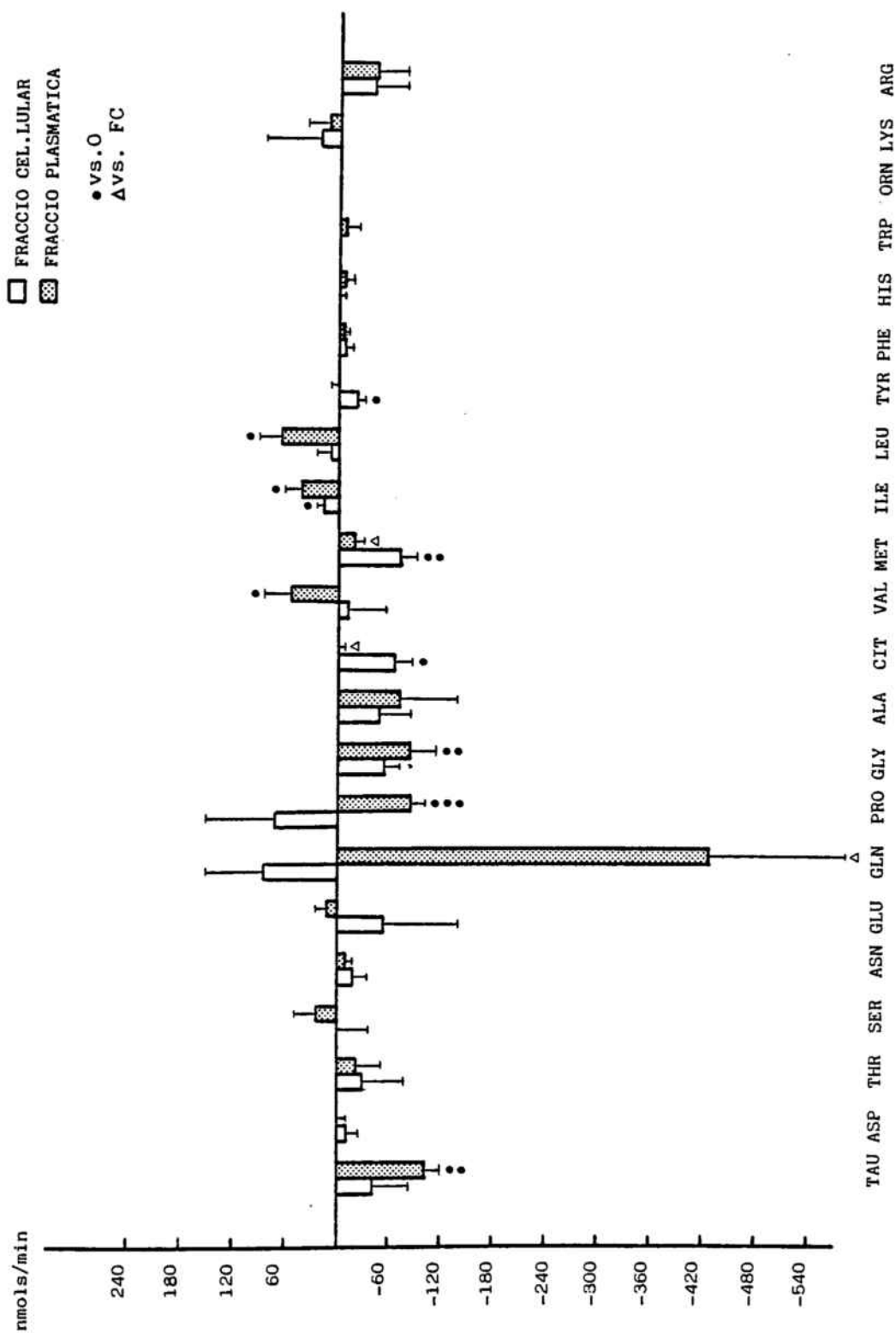
GRAFICA IV.1.1.7. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA IL.LIACA.
 SANG TOTAL. (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.1.8. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA IL.LIACA.

FRACCIONS SANGUINIES. (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



ronyó presenta una certa tendència a captar aminoàcids de la circulació essent significativa aquesta captació per aspartat, valina, isoleucina, leucina i fenilalanina. La resta d'aminoàcids, és a dir, taurina, treonina, serina, asparagina, glutamat, glutamina, prolina, glicina, alanina, citrul.lina, metionina, tirosina, histidina, triptofan, ornitina, lisina i arginina, presenten un balanç renal nul.

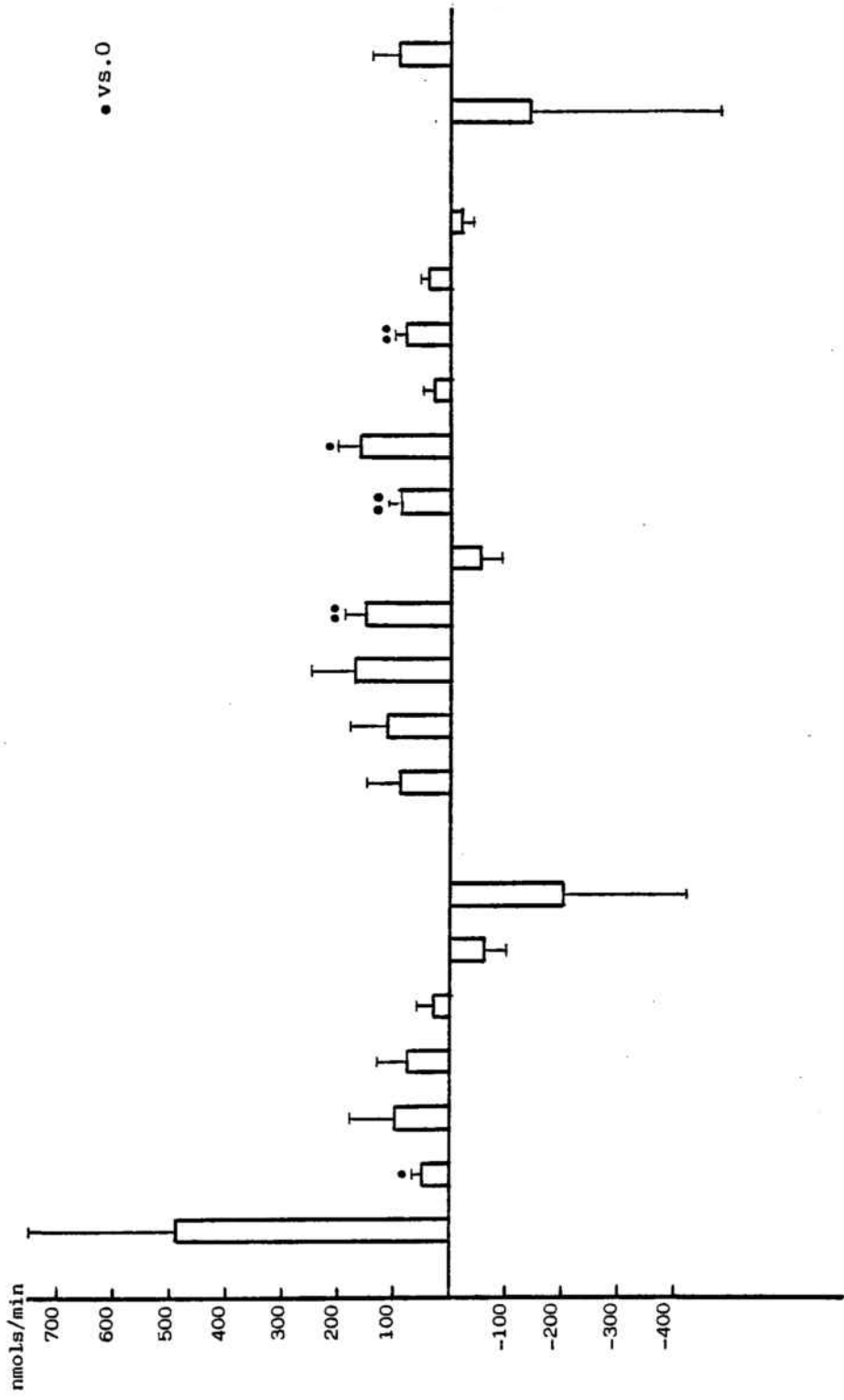
En la gràfica IV.1.10. es mostra la contribució de les dues fraccions sanguinies al balanç renal d'aminoàcids. El ronyó capta de la fracció plasmàtica de la sang de forma significativa aspartat, citrul.lina, isoleucina, leucina i fenilalanina, mentre que ho fa de la fracció corpuscular de la sang per glicina i arginina. Els únics alliberaments del ronyó són els de serina a la fracció plasmàtica de la sang i de glutamina a la fracció corpuscular. No s'observa cap cas de papers contraposats significativament però si es veuen diferències significatives en els casos de la serina i arginina.

IV.1.8. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular.

En la gràfica IV.1.11 es mostra el balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular (principalment cervell). Com es pot observar, hi ha una captació significativa de glicina, valina, isoleucina, leucina i fenilalanina, mentre que la resta d'aminoàcids presenta un balanç nul.

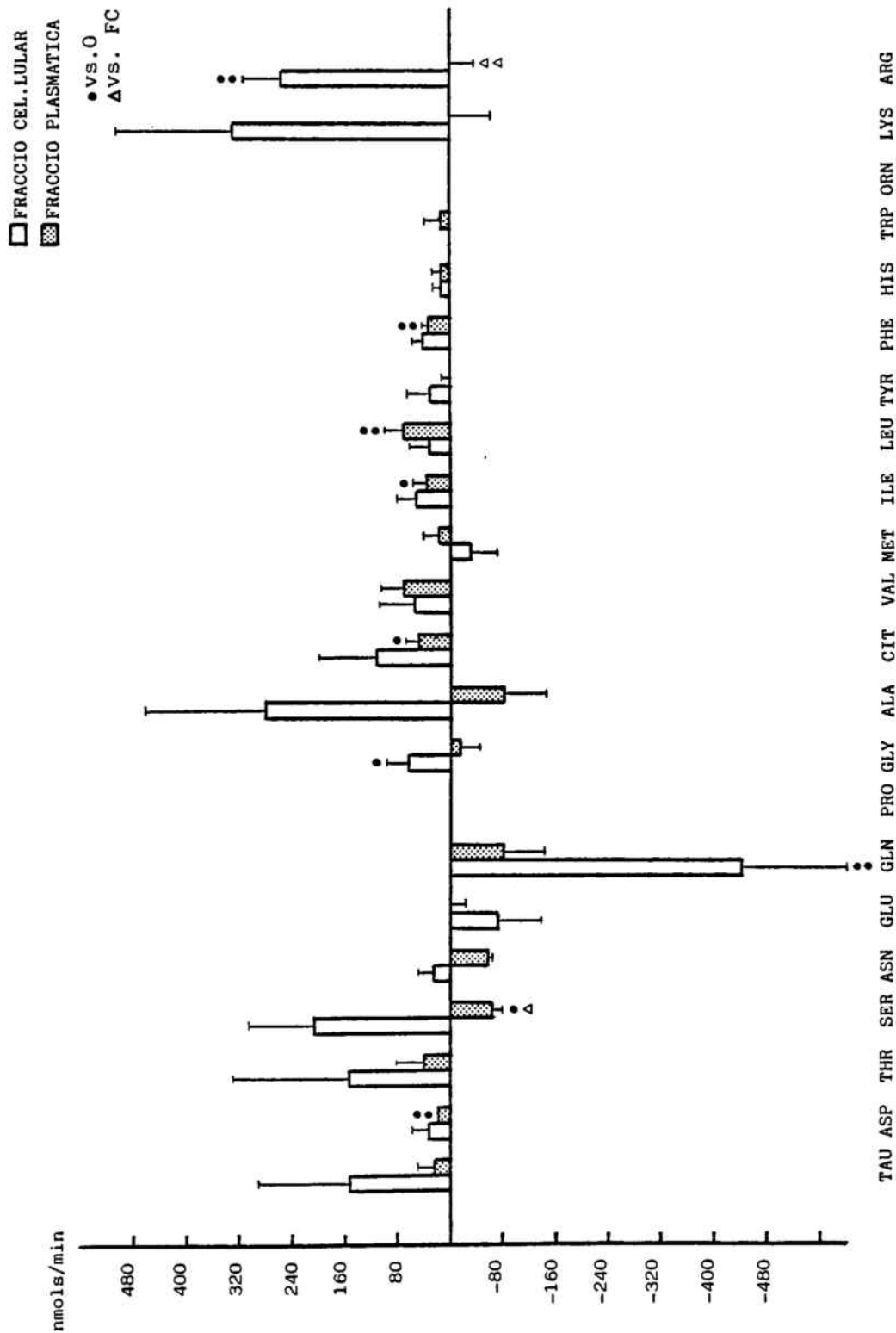
La contribució de les dues fraccions sanguinies al balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular es mostra en la gràfica IV.1.12. Com es pot observar, aquests teixits capten de la fracció plasmàtica de la sang glutamat, citrul.lina, valina i leucina, mentre que ho fan

GRAFICA IV.1.9. BALANÇ RENAL D'AMINOACIDS. SANG TOTAL. (ERITROCITS).
 (+) captació. (-) alliberament.



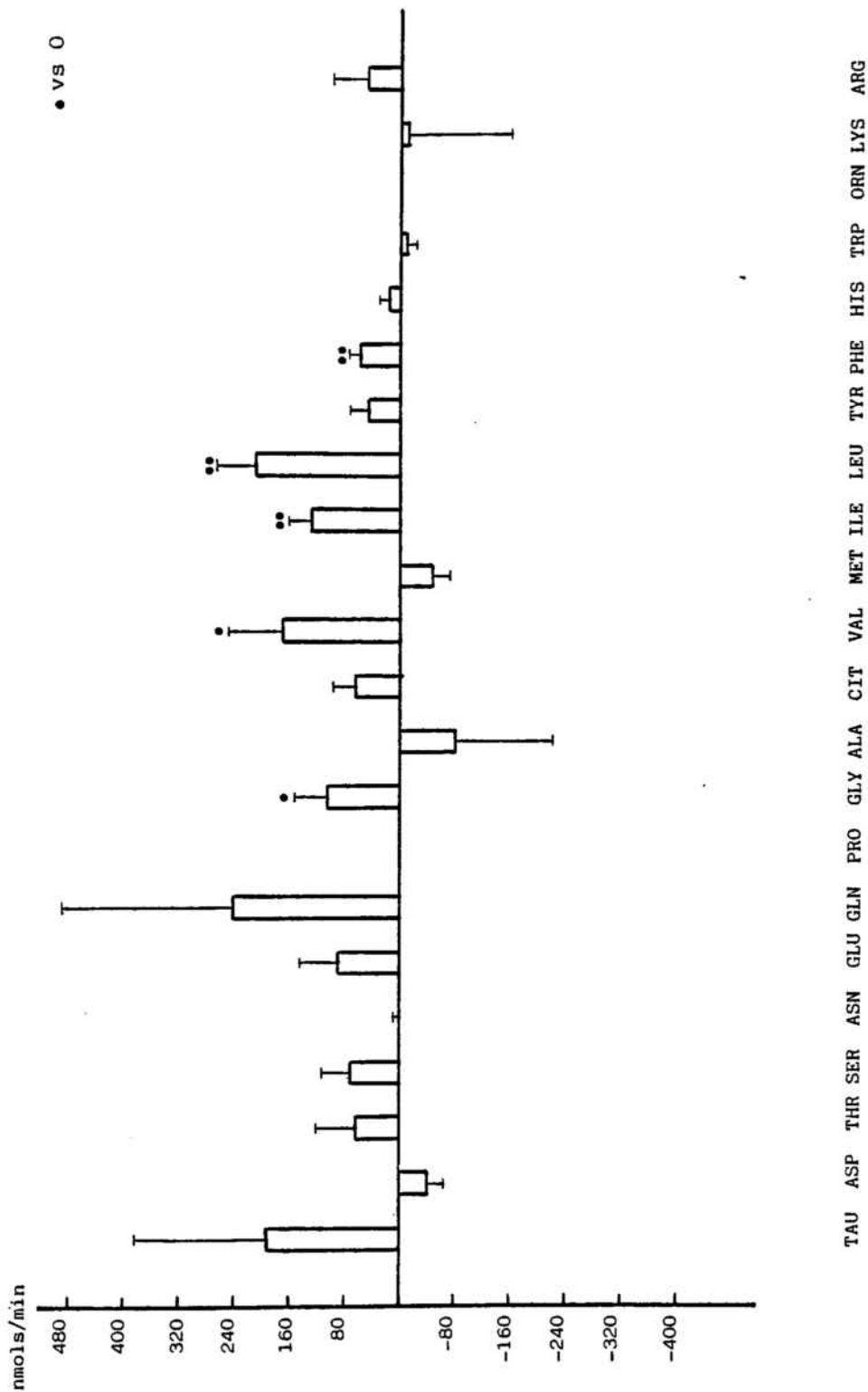
TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.1.10. BALANÇ RENAL D'AMINOACIDS. FRACCIONS SANGUINIES.
 (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



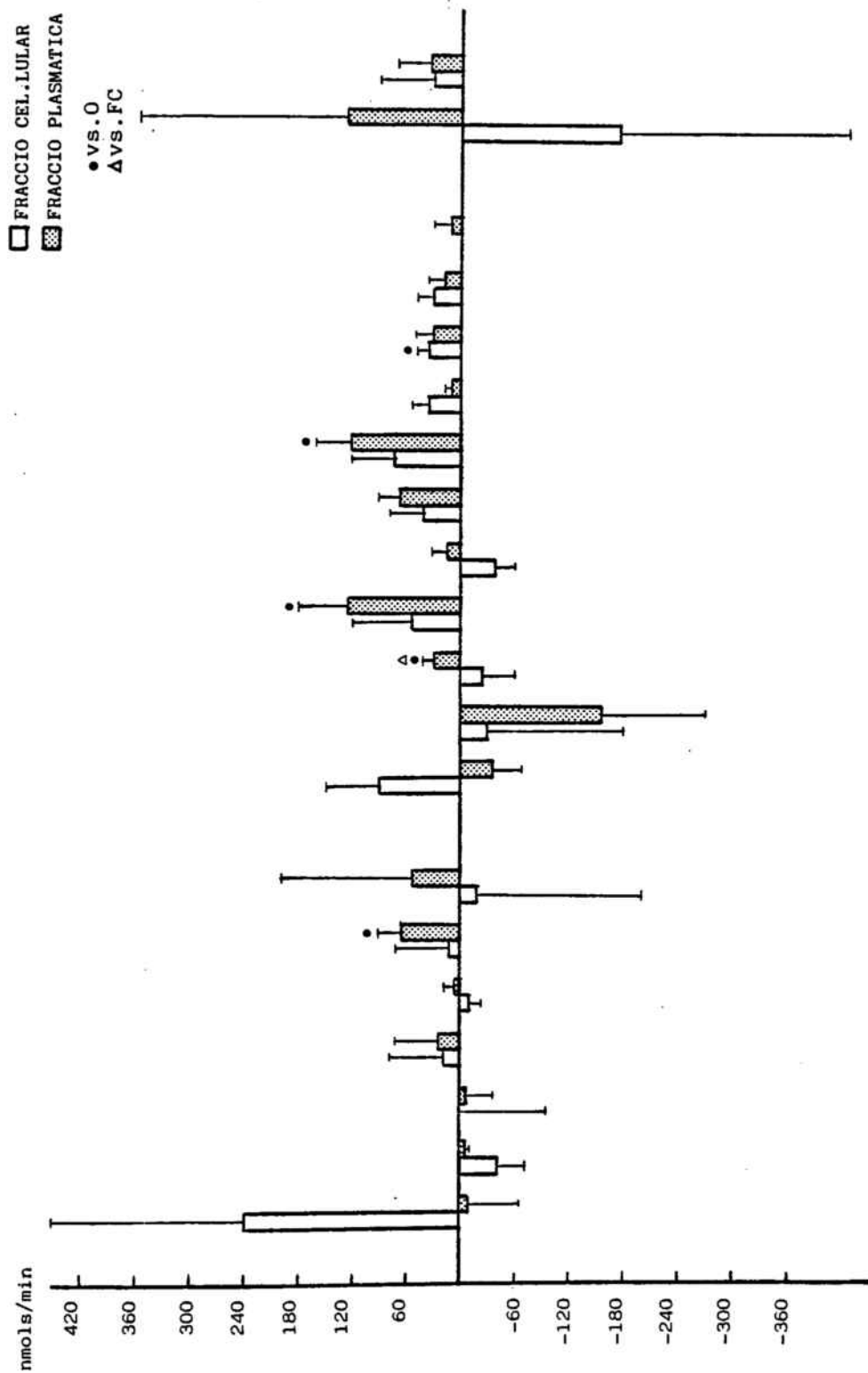
de la fracció corpuscular pel cas de la fenilalanina. No observem cap cas en que hi hagi un paper contraposat dels dos compartiments sanguinis, però pel cas de la citrulina existeixen diferències significatives.

GRAFICA IV.1.11. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA JUGULAR.
 SANG TOTAL. (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



GRAFICA IV.1.12. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA JUGULAR.

FRACCIONS SANGUINIES. (ERITROCITS). (+) captació. (-) alliberament.



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

IV.2. PART 2: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN ERITRÒCITS "IN VITRO"

IV.2.1. Comprovació del mètode.

En la gràfica IV.2.1 es mostra la captació d'alanina en eritròcits humans en funció dels temps A) segons es descriu en la bibliografia B) emprant el nostre protocol i càlculs. Com es pot observar existeix una gran similitud entre les dues representacions mostrant que els eritròcits humans transporten alanina, essent més alta la captació en presència de sodi en el medi.

La gràfica IV.2.2 ens mostra que durant els processos de rentat i d'incubació (fins a 2 hores) els nivells d'ATP intracel.lular no varien de forma significativa.

La taula IV.2.1 mostra que no existeix diferència en la radioactivitat mesurada en incubar aminoàcids (L-leucina, L-lisina i L-prolina en presència i absència de membranes cel.lulars, així com tampoc té efecte el fet d'utilitzar tritó com agent hemolitzant en la radioactivitat recuperada després de la incubació de L-prolina ja sigui desproteïntzant l'hemolitzat en presència o absència de membranes.

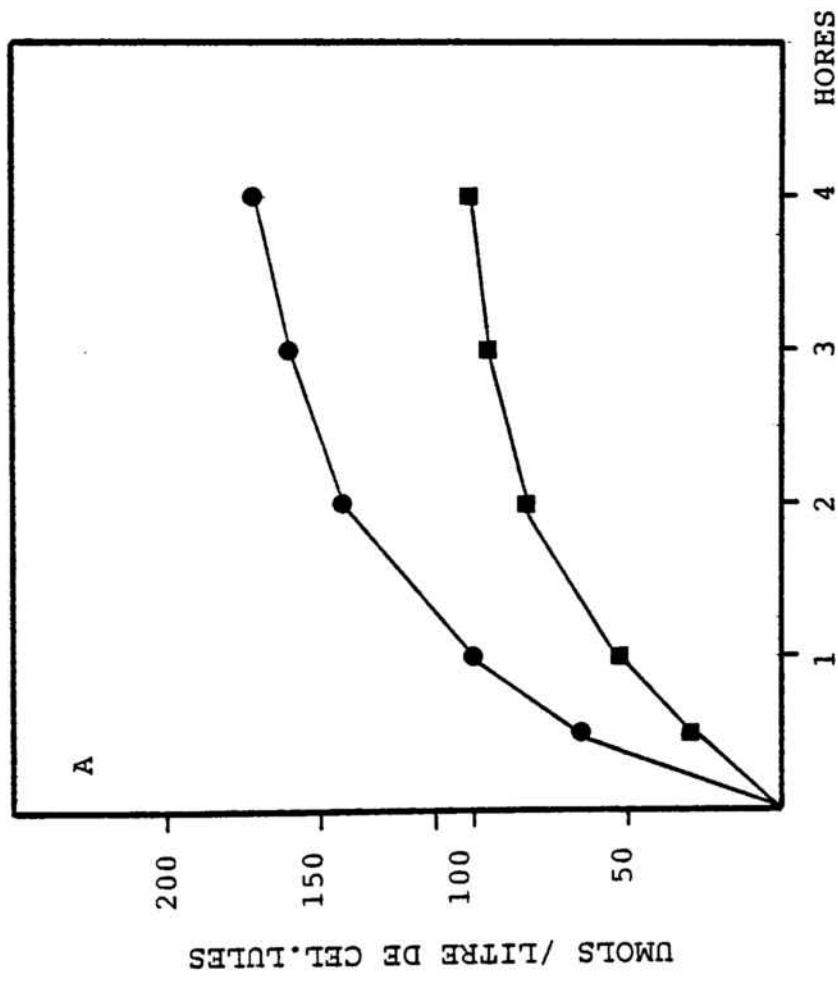
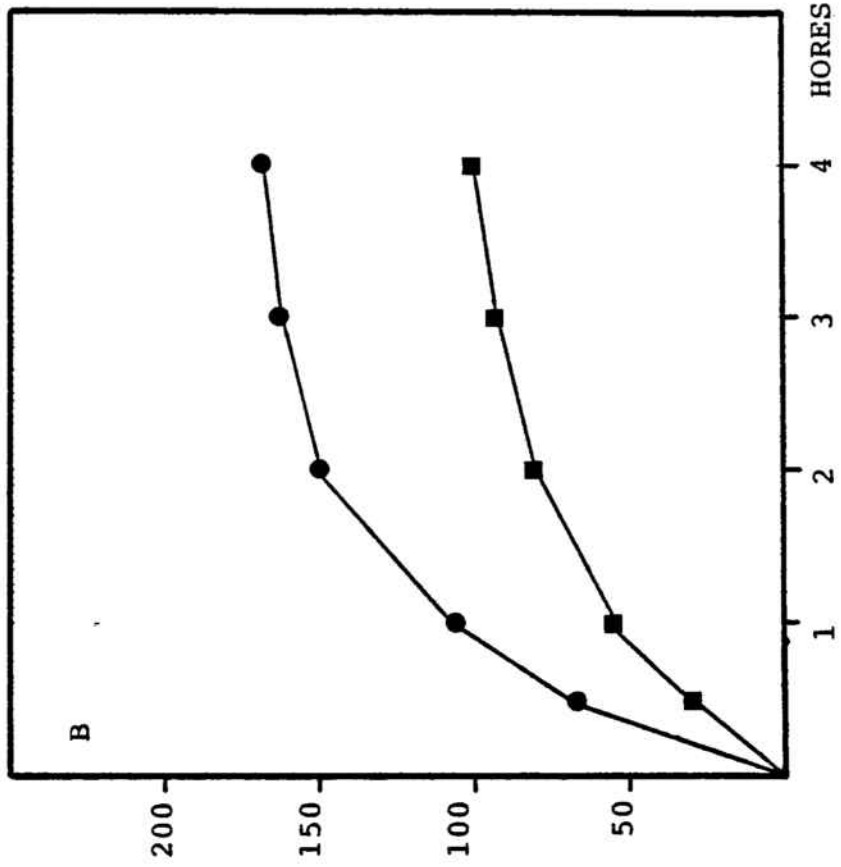
IV.2.2. Transport de L-alanina.

En la gràfica IV.2.3 es mostra la relació de concentració d'alanina dins i fora de les cèl.lules (relació IN/OUT) en funció del temps d'incubació dels eritròcits a 37 C i a una concentració inicial d'alanina en el medi de 0.2 mM i en presència de sodi o en la seva absència (en presència de potassi). Com es pot observar en absència de sodi el temps d'equilibració és aproximadament d'una hora

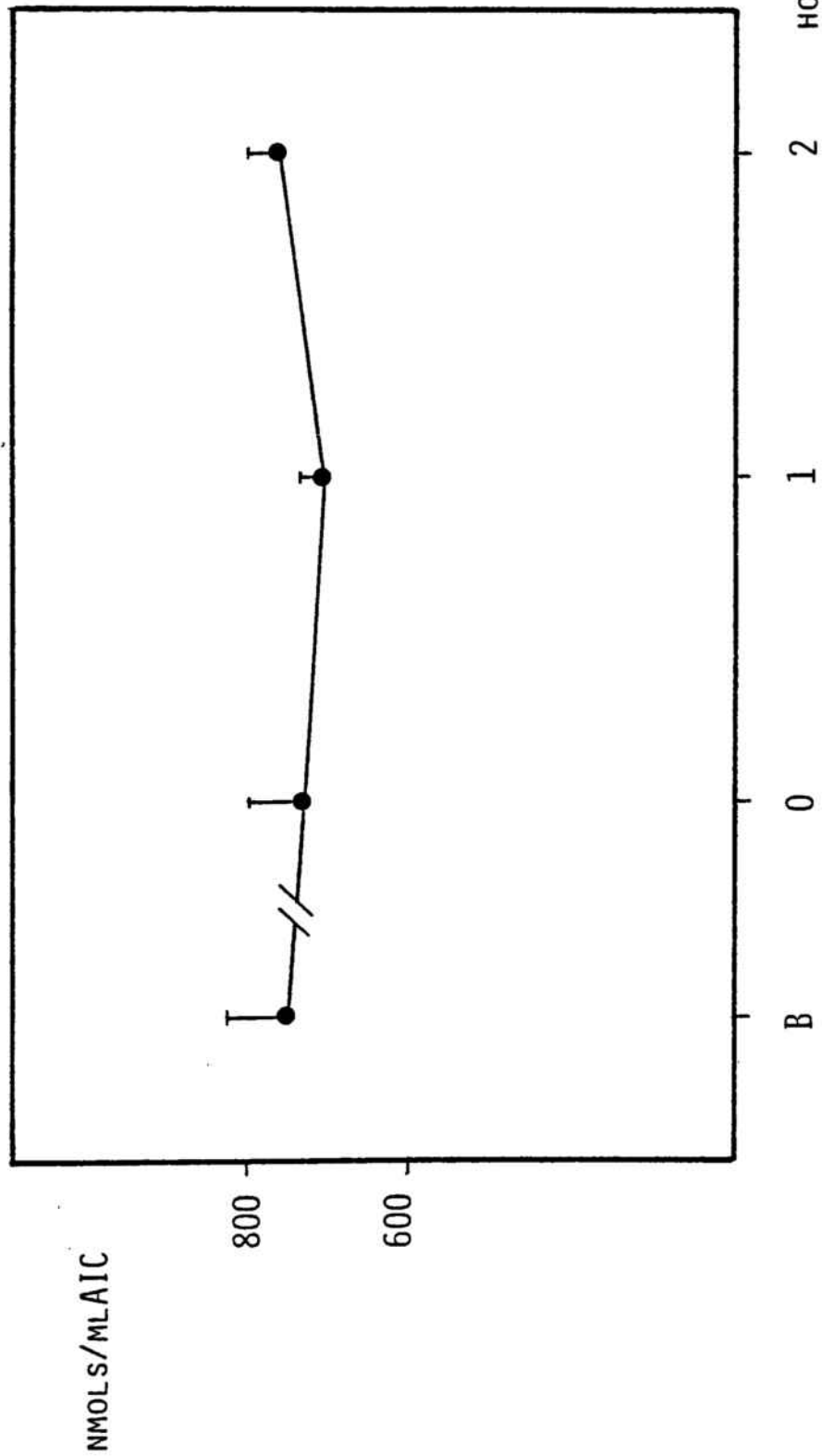
GRAFICA IV.2.1. CAPTACIO DE L-ALANINA PER ERITROCITS HUMANS. 37°C, 0.25 mM.

A- Resultats extrets de Young i col., (1983). B- Resultats propis.

● Na
■ K



GRAFICA IV.2.2. CONCENTRACIO D'ATP INTRACEL·LULAR EN ERITROCITS DURANT ELS PROCESSOS DE RENTAT I D'INCUBACIO.



TAULA IV.2.1. PROVA D'ADSORCIÓ DE MEMBRANA (valors en dpm).

Incubacions amb eritròcits realitzades a 37 C.

Concentració d'aminoàcids 0.2 mM

	<u>+MEMBRANA</u>	<u>-MEMBRANA</u>	
<u>amb tritó</u>			
L-Leu 10 s	3813±109	4017±29	ns
L-Leu 30 s	13344±726	13820±396	ns
L-Lys 10 s	1802±86	1979±201	ns
L-Lys 1 min.	6076±832	5284±287	ns
L-Pro 10 s	2266±429	1547±54	ns
L-Pro 1 min.	16692±123	17556±768	ns
<u>sense tritó</u>			
L-Pro 10 s	1424±60	1421±137	ns
L-Pro 1 min	13739±342	12375±1058	ns

Estadística: ns, no significatiu respecte a +membrana.

assolint-se una relació IN/OUT de 1. Quan el sodi és present la relació assolida és del voltant de 1.3 als 120 minuts d'incubació.

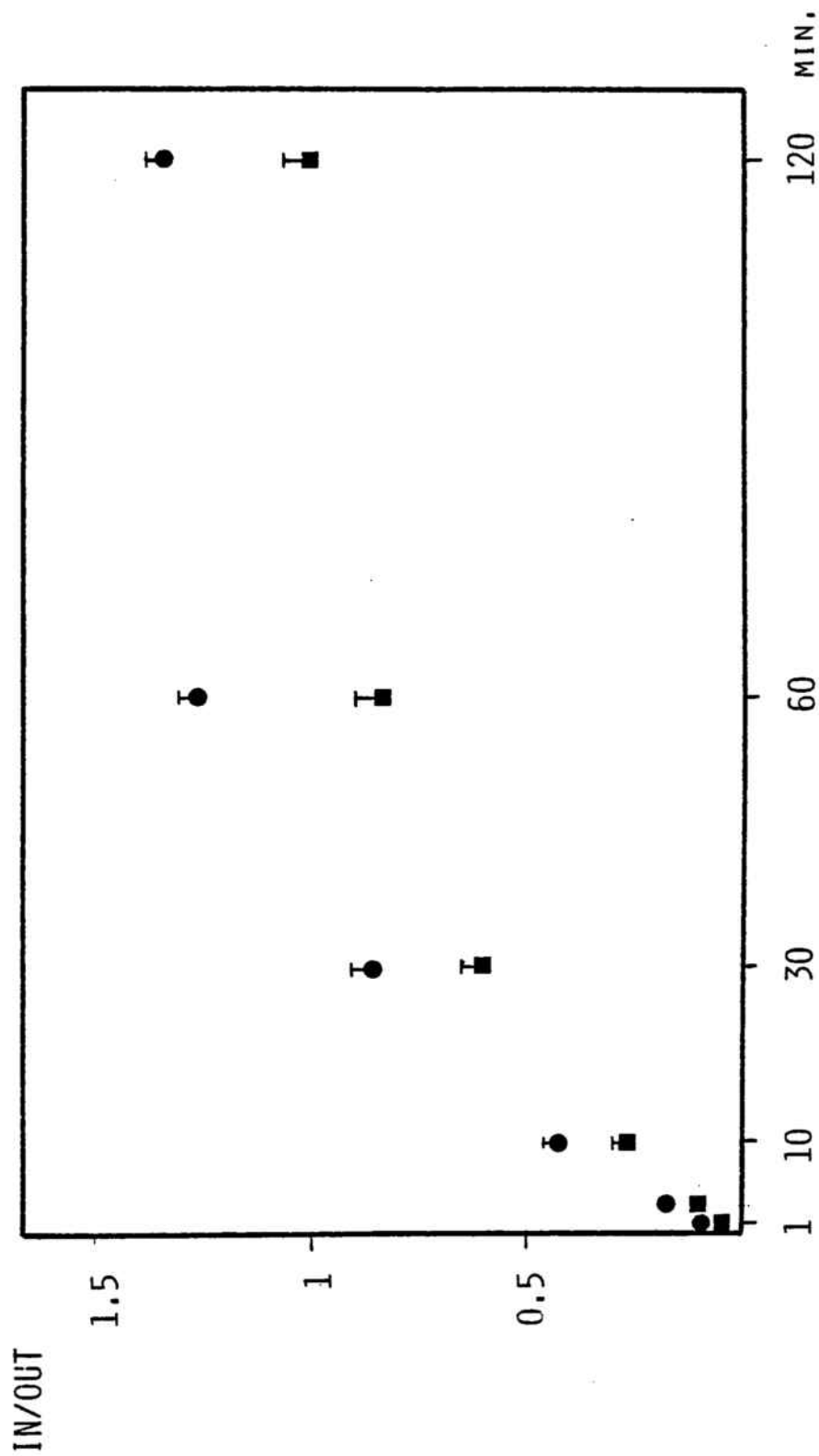
La cinètica del transport de L-alanina es mostra en la gràfica IV.2.4. Com es pot observar existeix un component dependent de sodi que segueix una cinètica saturable ($V_{m\grave{a}x}$: 52.15 nmols/mlAIC/min. K_m : 0.257 mM) i un component linial (r : 0.999, K_d : 0.0378 min^{-1}). El component dependent de sodi representa aproximadament 1/3 del transport total a concentracions menors de 1mM i 1/10 a una concentració de 5 mM. El transport ha estat mesurat a 37 C i durant 3 minuts.

La linialització (representació d'Eadie-Hoffstee) del transport d'alanina dependent de sodi es mostra en la gràfica IV.2.5. Aquesta linialització dóna dos components: A- $V_{m\grave{a}x}$: 125 nmols/mlAIC/min., K_m : 1.71 mM. B- $V_{m\grave{a}x}$: 8.83 nmols/mlAIC/min., k_m : 0.023 mM.

En la taula IV.2.2 es mostren les inhibicions produïdes per diferents aminoàcids (concentració de 10 mM, glutamat 3 mM sobre el transport de L-alanina (concentració 0.01 mM). Com es pot comprovar, L-alanina, glicina, L-leucina, L-glutamina, L-valina, AIB, L-serina, L-treonina, D-alanina, L-fenilalanina, L-isoleucina, L-histidina, L-triptofan i L-metionina inhibeixen significativament el transport total de la L-alanina. El transport no dependent de sodi és inhibït per D-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-isoleucina i L-histidina. La L-arginina estimula el transport total i l'independent de sodi i la sarcosina només el total. La L-lisina, L-glutamat, MeAIB i la ?-alanina no tenen cap efecte inhibidor.

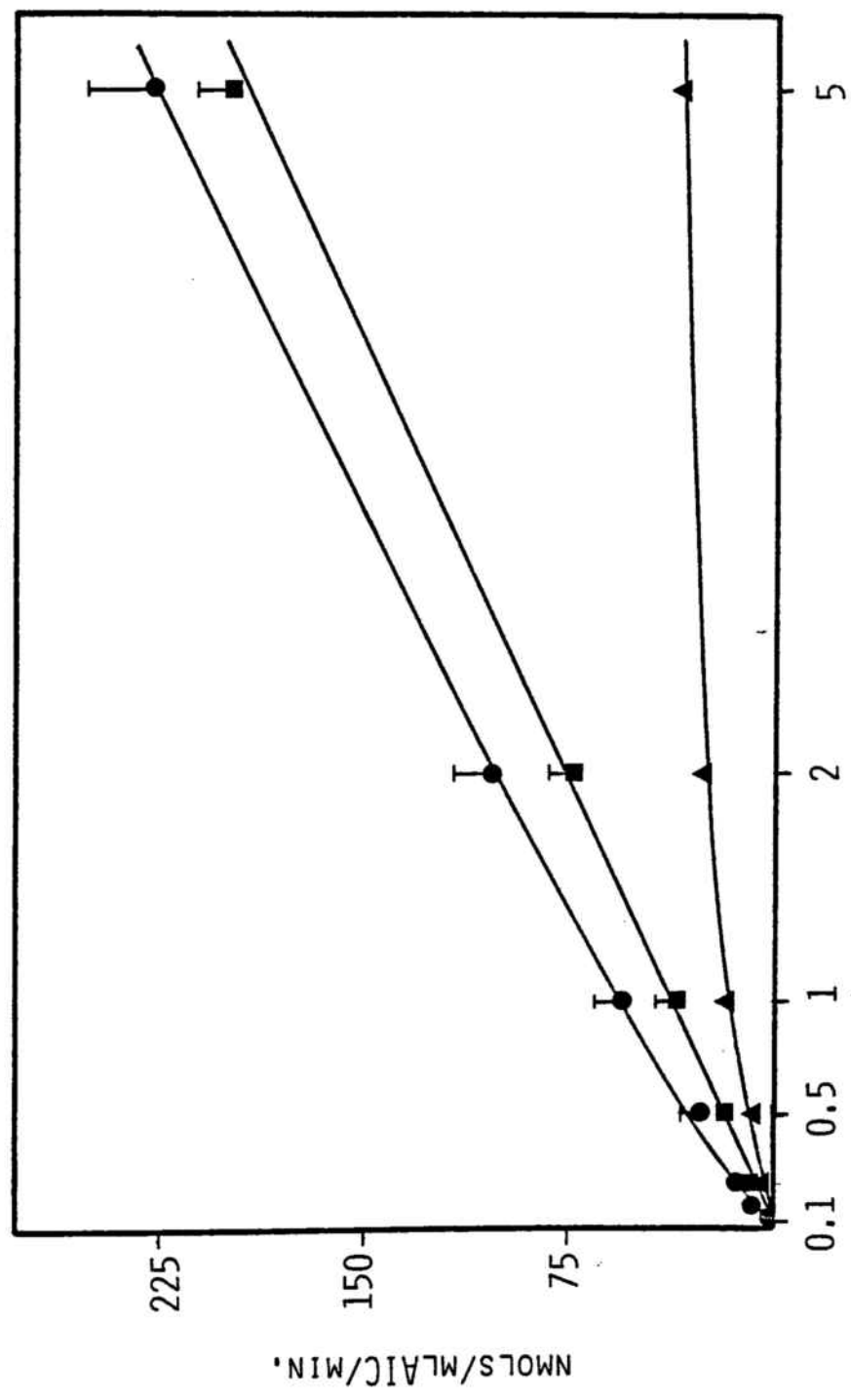
GRAFICA IV.2.3. CAPTACIO DE 14-C ALANINA PER ERITROCITS. (37°C, 0.2 mM).

● Na⁺
■ K⁺



GRAFICA IV.2.4. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-C ALANINA EN ERITROCITS. (37°C, 3 MIN.)

- Na^+
- K^+
- ▲ $Na^+ - K^+$



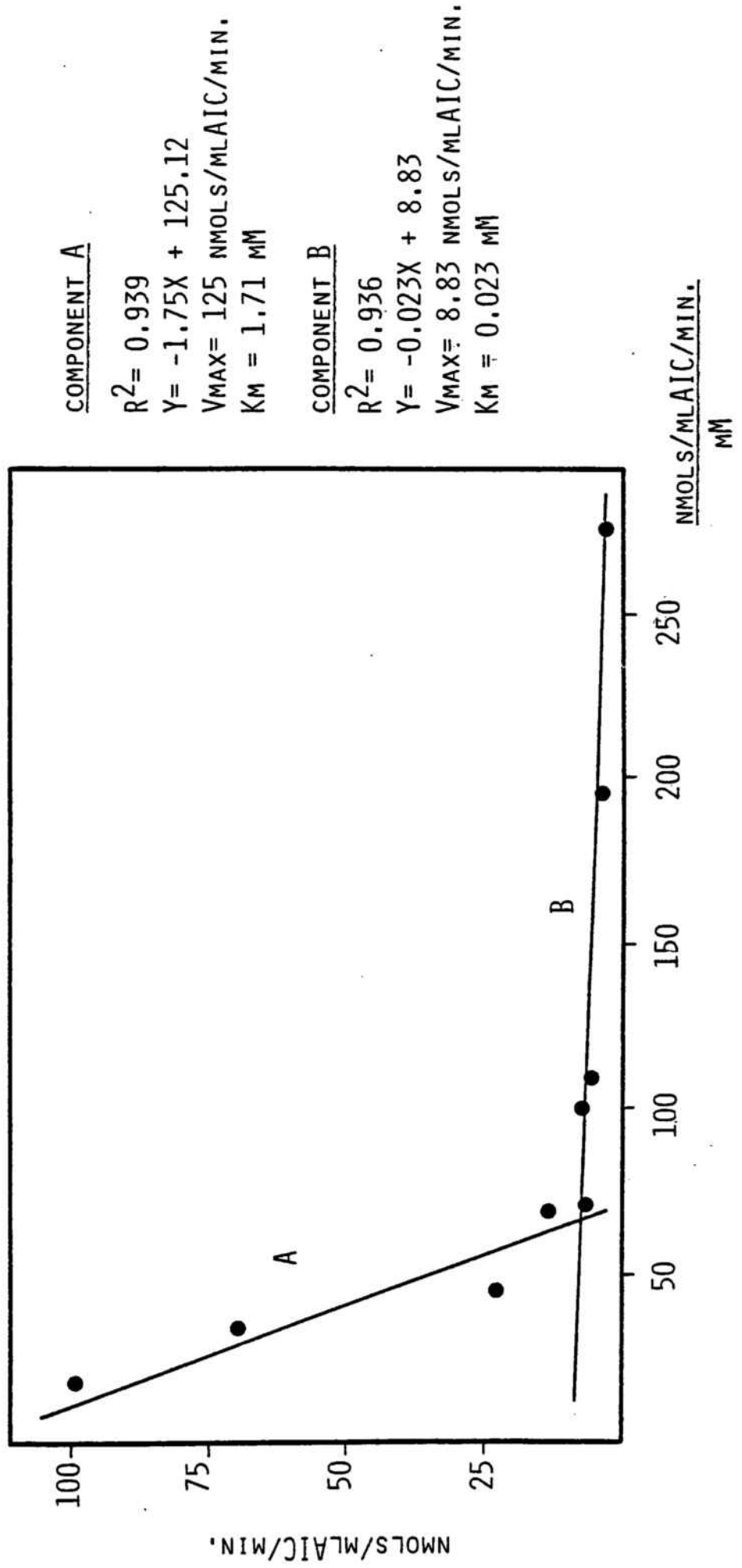
COMPONENT K^+

$R^2 = 0.999$
 $K_D = 0.0378 \text{ MIN}^{-1}$

COMPONENT $Na^+ - K^+$

$V_{MAX} = 52.15 \text{ NMOLS/MLAIC/MIN.}$
 $K_M = 0.257 \text{ MM}$

GRAFICA IV.2.5. LINIALITZACIO DEL TRANSPORT DE Na^+ D'ALANINA EN ERITROCITS
(37°C, 3 MIN.)



TAULA IV.2.2. INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE L-ALANINA EN ERITRÒCITS.

Inicial Na^+ :1.1 nmols/mlAIC/min. K^+ :0.63. Na^+-K^+ :0.45
 Alanina basal 10 uM. Inhibidors 10 mM (L-glu 0.3 mM).
 Valors:% del valor basal (sense inhibidor).

<u>INHIBIDOR</u>	<u>Na⁺</u>	<u>K⁺</u>	<u>Na⁺-K⁺</u>
L-Ala	63.2±2.2 ***	100.0±8.4 ns	11.8
Gly	72.9±3.5 **	125.1±9.3 ns	0
L-Leu	57.3±4.2 ***	82.0±9.0 ns	22.7
D-Leu	89.7±5.7 ns	85.9±4.8 *	94.9
L-Lys	101.5±3.5 ns	131.8±22.2 ns	59.4
L-Pro	83.6±1.4 ***	110.1±4.8 ns	46.7
L-Glu	92.8±5.7 ns	101.6±4.2 ns	80.6
L-Gln	67.3±3.0 ***	89.6±4.7 ns	36.2
L-Val	64.0±3.5 ***	100.8±11.8 ns	12.8
AIB	85.9±2.6 **	97.5±4.8 ns	69.6
MeAIB	110.9±9.2 ns	96.7±2.3 ns	130.8
L-Ser	61.7±2.2 ***	100.0±9.7 ns	15.0
L-Thr	75.6±7.2 *	76.5±7.7 *	73.8
D-Ala	87.2±3.5 *	114.6±9.7 ns	53.8
?-Ala	94.4±8.7 ns	104.4±7.1 ns	98.0
L-Phe	62.2±2.0 ***	66.1±10.0 *	57.6
L-Ile	54.2±4.5 ***	69.9±5.5 **	35.1
L-His	46.6±5.8 ***	68.2±3.0 ***	20.4
L-Arg	124.3±4.1 **	141.2±12.3 *	103.9
L-Trp	77.7±1.5 ***	95.2±7.5 ns	56.5
L-Met	56.3±1.2 ***	102.7±12.9 ns	0
Sarcosina	114.7±3.5 *	113.4±5.9 ns	116.2

Estadística:* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 respecte a la captació basal (sense inhibidors).

IV.2.3. Transport de glicina.

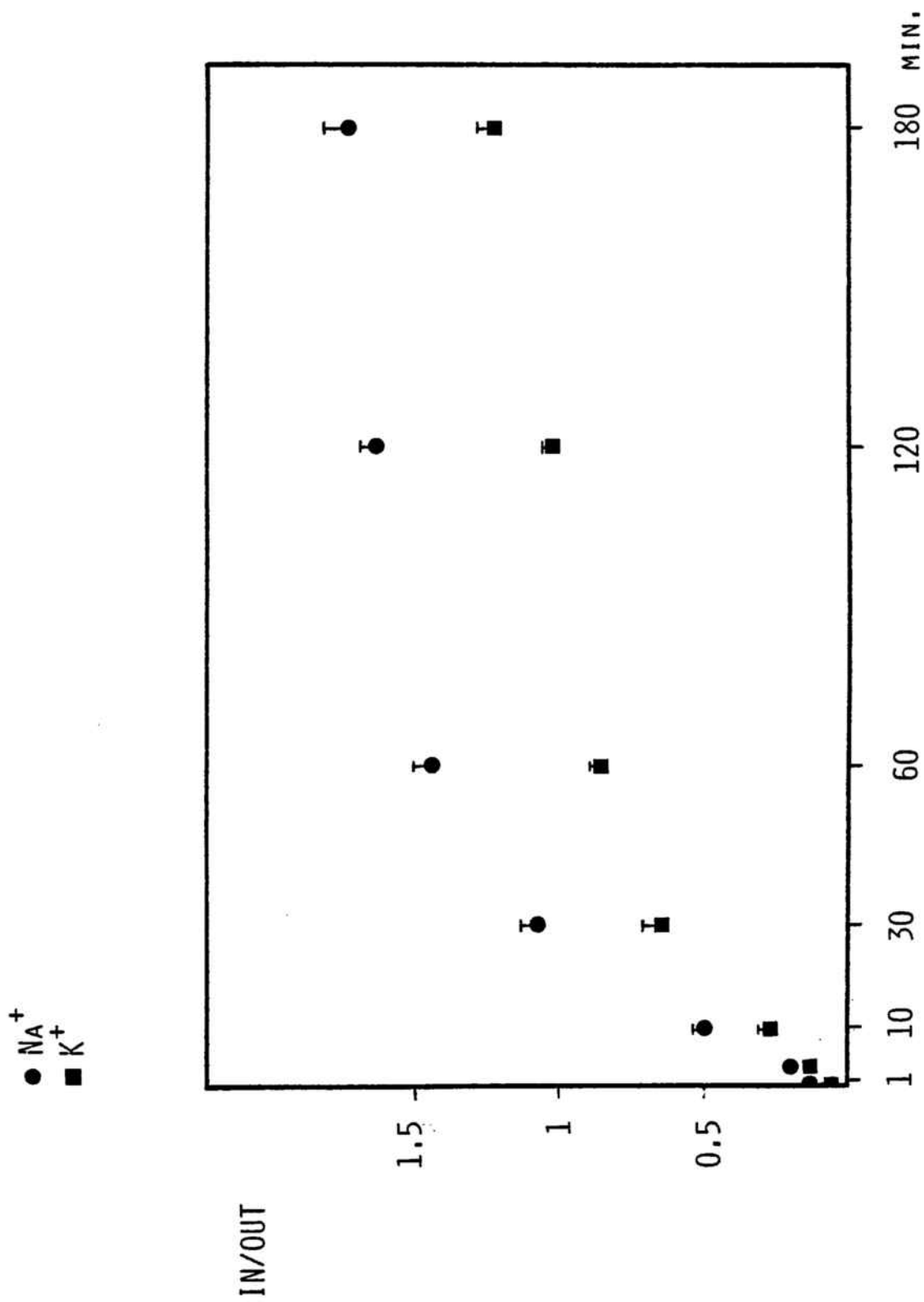
En la gràfica IV.2.6. es mostra la captació en funció del temps de glicina mesurada a 37 C i amb una concentració inicial de glicina en el medi de 0.2. mM, en presència i absència de sodi. Com es pot observar, en absència de sodi la concentració de glicina dins i fora de la cèl.lula s'equilibra als 180 minuts d'incubació assolint una relació de concentracions IN/OUT de 1. Quan hi ha sodi en el medi la relació IN/OUT assoleix el valor de 1.6 als 180 minuts d'incubació.

En la gràfica IV.2.7 es mostra la cinètica del transport de glicina mesurat a 37 C i 3 minuts d'incubació, en un marge de concentracions de 0.01 a 1 mM. Com es pot observar, el component dependent de sodi és saturable, obtenint una $V_{m\grave{a}x.}$ de 15.66 nmols/mlAIC/min. i una K_m de 0.115 mM. A concentracions baixes (<0.2 mM) supera al component linial no dependent de sodi, essent aproximadament la meitat del transport total. A més altes concentracions predomina el component linial, essent el dependent de sodi 1/4 part del total a una concentració de 1 mM. El component linial presenta una K_d de 0.059 min.^{-1} .

En la gràfica IV.2.8 es mostra la linialització del transport de glicina dependent de sodi. Com es pot observar existeixen dos components: A- $V_{m\grave{a}x.}$: 31.1 nmols/mlAIC/min., K_m : 0.414 mM. B- $V_{m\grave{a}x.}$: 5.126 nmols/mlAIC/min., K_m : 0.025 mM.

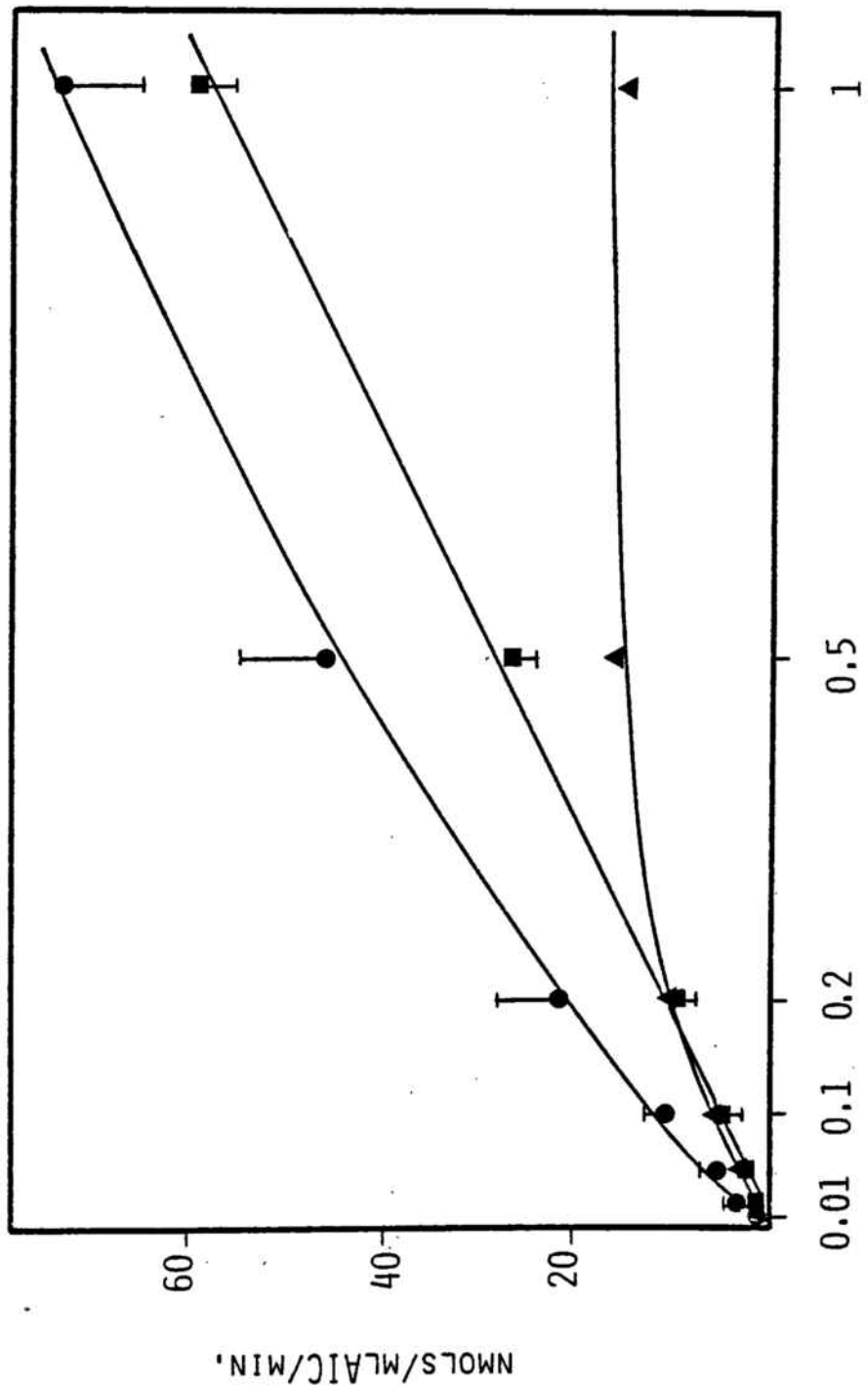
En la taula IV.2.3 es mostren les inhibicions produïdes per L-alanina i sarcosina (concentració 10 mM) sobre el transport de glicina (concentració 0.01 mM). Com es pot observar, la L-alanina no produeix inhibició ni del transport total ni de l'independent de sodi, ni del

GRAFICA IV.2.6. CAPTACIO DE 14-C GLICINA PER ERITROCITS. (37°C, 0.2 mM).



GRAFICA IV.2.7. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-C GLICINA EN ERITROCITS. (37°C, 3 MIN.)

- Na^+
- K^+
- ▲ $Na^+ - K^+$



COMPONENT K^+

$$R^2 = 0.998$$

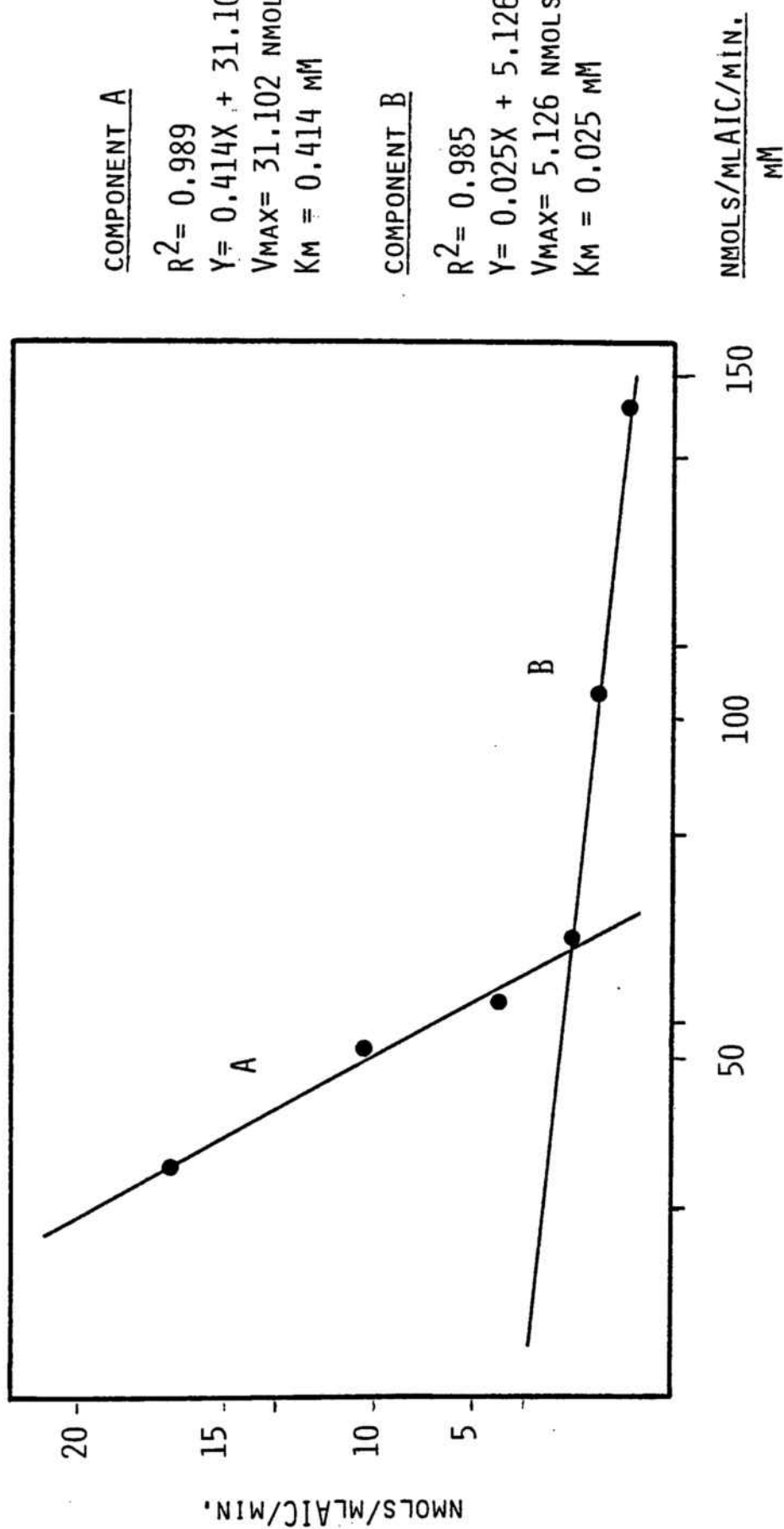
$$K_D = 0.059$$

COMPONENT $Na^+ - K^+$

$$V_{MAX} = 15.66 \text{ NMOLS/MLAIC/MIN.}$$

$$K_M = 0.115 \text{ mM}$$

GRAFICA IV.2.8. LINIALITZACIO DEL TRANSPORT DE Na^+ DE GLICINA EN ERITROCITS.
(37°C, 3 MIN.)



TAULA IV.2.3. INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE GLICINA EN ERITRÒCITS.

Inicial: Na^+ :1.01 nmols/mlAIC/min. K^+ :0.41. $\text{Na}-\text{K}^+$:0.63

Valors: % d'inhibició respecte als valors inicials.

Concentració de glicina basal 10 uM. Inhibidors a 10 mM.

<u>INHIBIDOR</u>	<u>Na⁺</u>	<u>K⁺</u>	<u>Na⁺-K⁺</u>
L-Ala	100.6±3 ns	99.2±8 ns	101.6
Sarcosina	44.4±3 ***	107.3±5 ns	3.7

Estadística:*** $p < 0.001$ respecte a la captació basal de glicina (sense inhibidor).

TAULA 2.4. DEPENDÈNCIA AL Cl^- DEL TRANSPORT DEPENDENT DE Na^+
DE GLICINA EN ERITRÒCITS.

Concentració de glicina 0.1 mM. Temps d'incubació 3 min. a
37 C.

Resultats de captació en nmols/mlAIC/min.

<u>ANIO</u>	<u>CAPTACIÓ</u>	<u>%INHIBICIÓ</u>
Clorur	34.9±1.6	-
Formiat	24.1±1.9 ***	31.2
Acetat	17.1±1.7 ***	51.1

Estadística:*** p < 0.001 respecte a la captació amb l'anió
clorur.

dependent de sodi, mentre que la sarcosina inhibeix de forma significativa el transport en presència de sodi de glicina.

La dependència al Cl^- del transport de glicina en presència de sodi es mostra en la taula IV.2.4. Com es pot observar la substitució del Cl^- en el medi d'incubació per ió formiat ó acetat produeix una inhibició significativa del transport de glicina (concentració 0.1 mM) en presència de sodi.

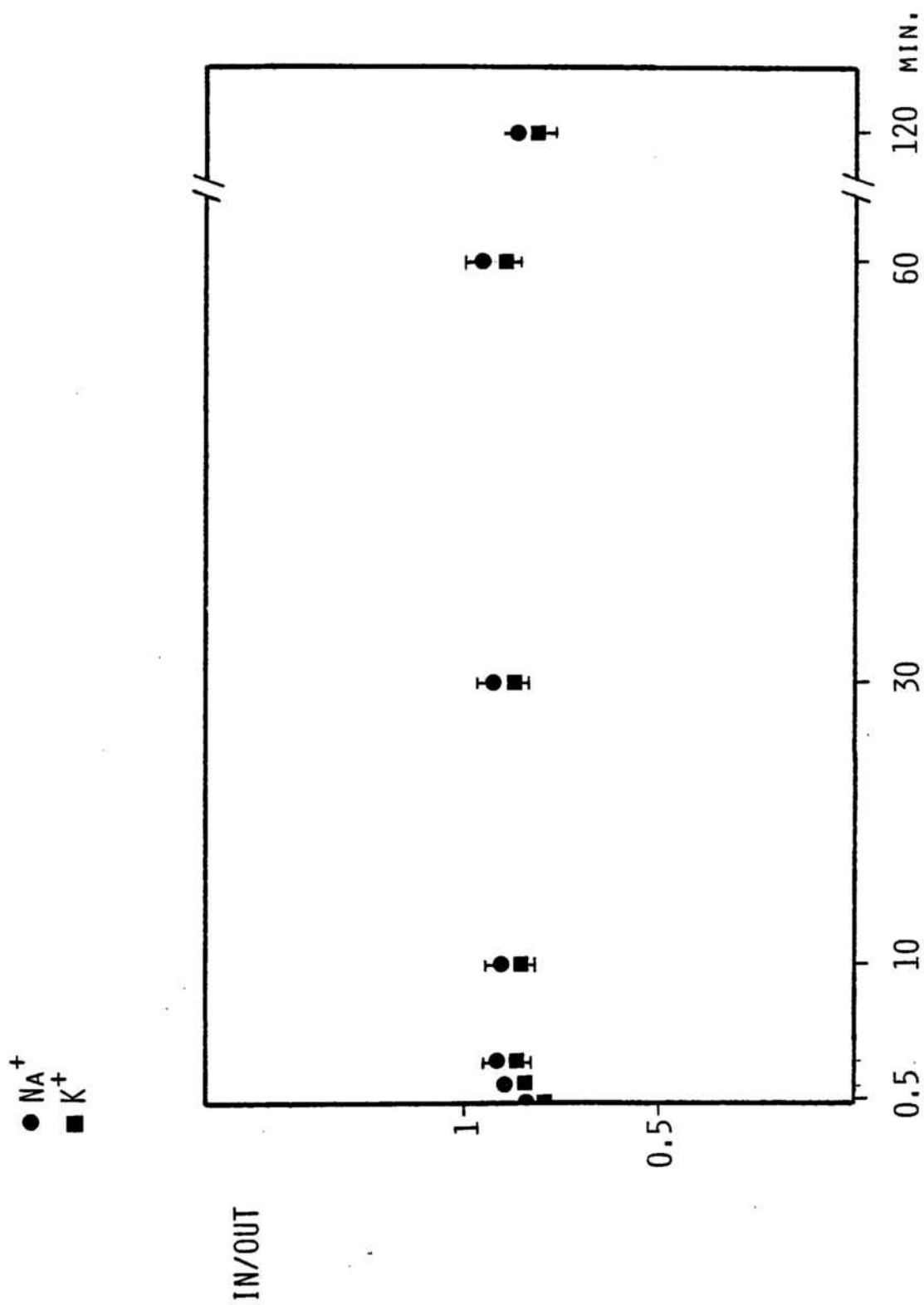
IV.2.4. Transport de L-leucina.

La captació en funció del temps de L-leucina es mostra en la gràfica IV.2.9, mesurada a 37 C i a una concentració de L-leucina inicial en el medi de 0.2 mM. Com es pot observar, al temps mínim mesurat, 0.5 minuts, la captació arriba a equilibrar-se assolint una relació IN/OUT propera a 1, la qual es manté pràcticament invariable fins a 120 minuts d'incubació. No s'observen diferències en la presència ó absència de sodi.

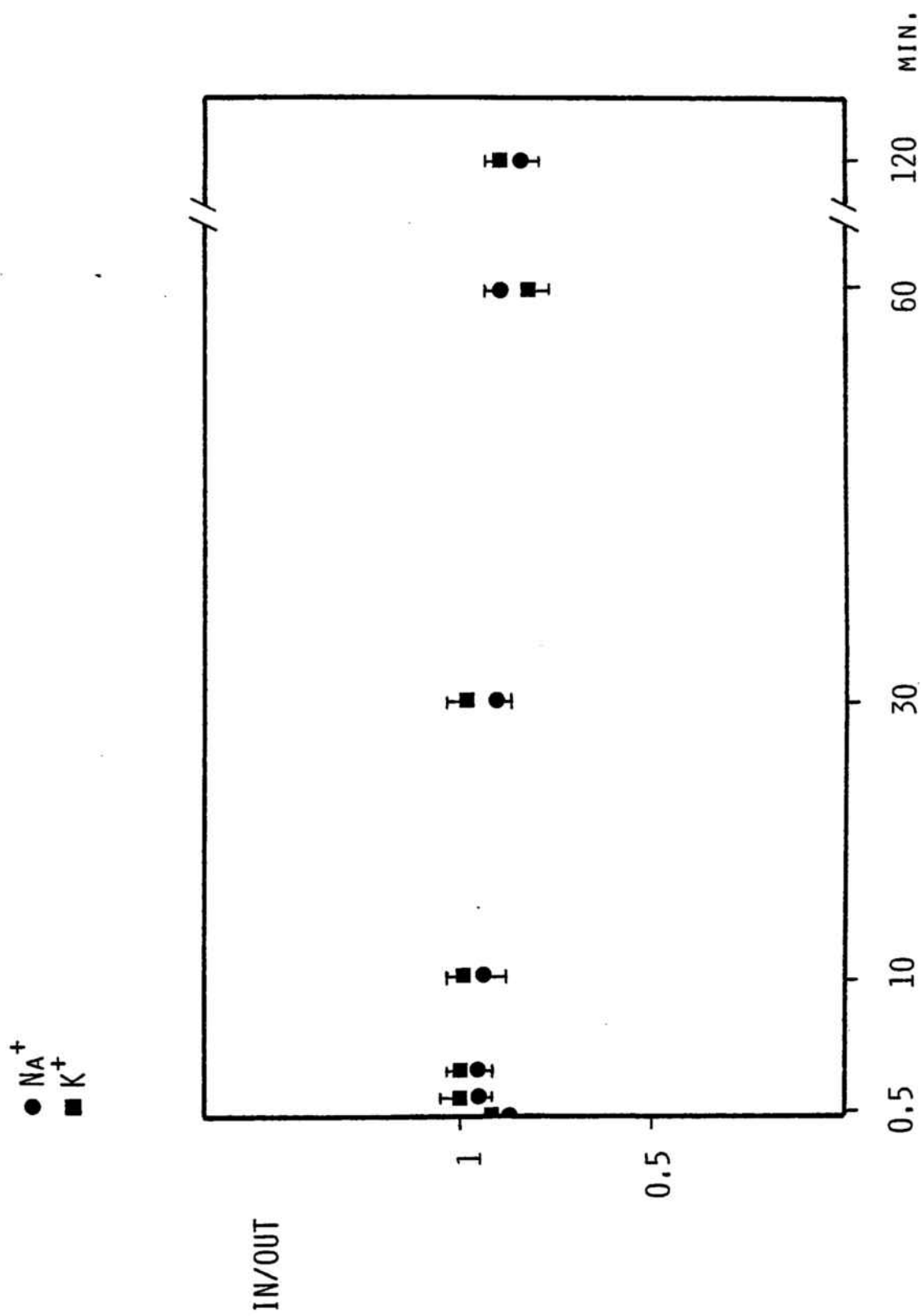
La gràfica IV.2.10 mostra la captació de L-leucina en funció del temps mesurada a 20 C i a una concentració inicial de L-leucina en el medi de 0.2 mM. Com es pot observar a partir de 1 minut d'incubació s'equilibra la captació arribant a una relació IN/OUT de 1 la qual apenes es modifica durant 120 minuts d'incubació. No s'observen diferències quan a la presència ó absència de sodi en el medi.

En la gràfica IV.2.11 es mostra la cinètica del transport de L-leucina mesurada a 20 C i 0.5 minuts d'incubació, en un marge de concentracions de 0.1 a 40 mM. Com es pot observar el transport de leucina és saturable obtenint-se una $V_{m\grave{a}x}$. de 6.42 $\mu\text{mols/mlAIC}/\text{min}$. i una K_m de

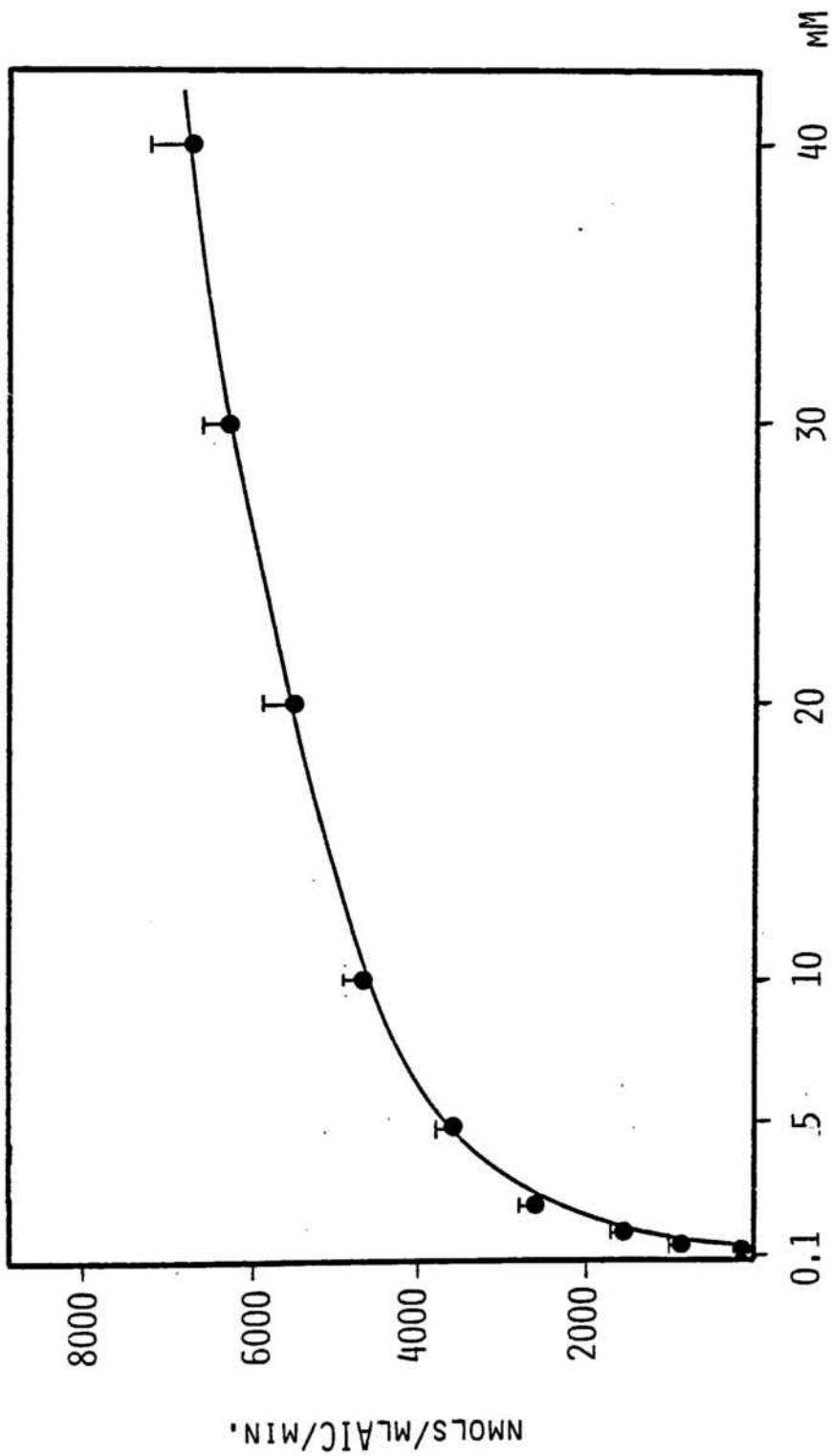
GRAFICA IV.2.9. CAPTACIO DE 14-C LEUCINA PER ERITROCIT. (37°C, 0.2 MM).



GRAFICA IV.2.10. CAPTACIO DE 14-C LEUCINA PER ERITROCIT. (20°C, 0.2 mM).

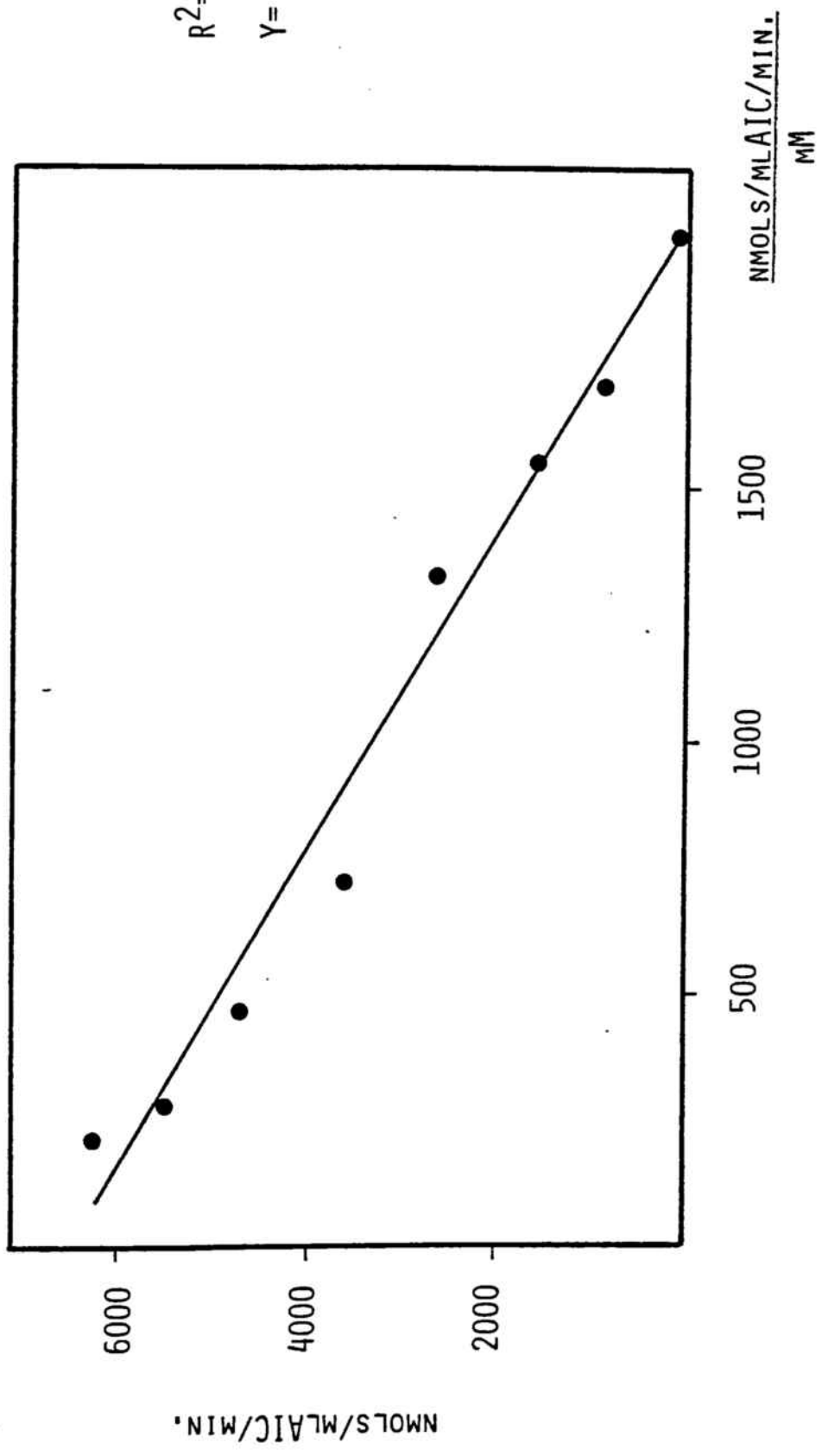


GRAFICA IV.2.11. CINETICA DE 14-C LEUCINA PER ERITROCITS. (20°C, 0.5 MIN).



$V_{MAX} = 6.42 \text{ UMOLS/MLAIC/MIN.}$
 $K_M = 3.16 \text{ MM}$

GRAFICA IV.2.12. LINIALITZACIO DEL TRANSPORT DE 14-C LEUCINA EN ERITROCITS. (20°C, 0.5 MIN).



TAULA IV.2.5. INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE L-LEUCINA EN ERITRÒCITS.

Transport basal: 16.54 nmols/mlAIC/min.

L-leucina basal 10 uM. Inhibidors 10 mM. (L-Glu 3 mM)

Valors % del transport basal (en absència d'inhibidors).

Incubació 0.5 min a 37 C.

<u>INHIBIDOR</u>	<u>CAPTACIÓ</u>	<u>INHIBIDOR</u>	<u>CAPTACIÓ</u>
D-Leu	109.3±4.0 ns	L-Lys	97.5±3.2 ns
L-Pro	89.7±1.6 **	L-Ala	101.9±6.5 ns
Gly	93.1±2.4 ns	L-Glu	98.5±2.2 ns
L-Gln	97.1±2.1 ns	L-Val	108.7±10.0 ns
AIB	82.5±4.1 *	MeAIB	89.5±2.6 *
L-Ile	109.1±9.1 ns	L-Phe	89.8±0.7 **
L-Arg	74.9±6.1 *	L-Ser	81.6±6.7 *
L-Thr	54.9±2.9 ***	D-Ala	62.2±7.1 **
?-Ala	54.3±2.2 ***	L-His	55.9±5.7 ***
Sarcosina	49.9±2.3 ***	L-Trp	57.6±3.6 ***
L-Met	98.6±4.3 ns		

Estadística: * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 respecte a la captació basal de leucina (sense inhibidor).

3.16 mM.

La linialització del transport de L-leucina es mostra en la gràfica IV.2.12. Existeix un sol component amb una coeficient de correlació de 0.988.

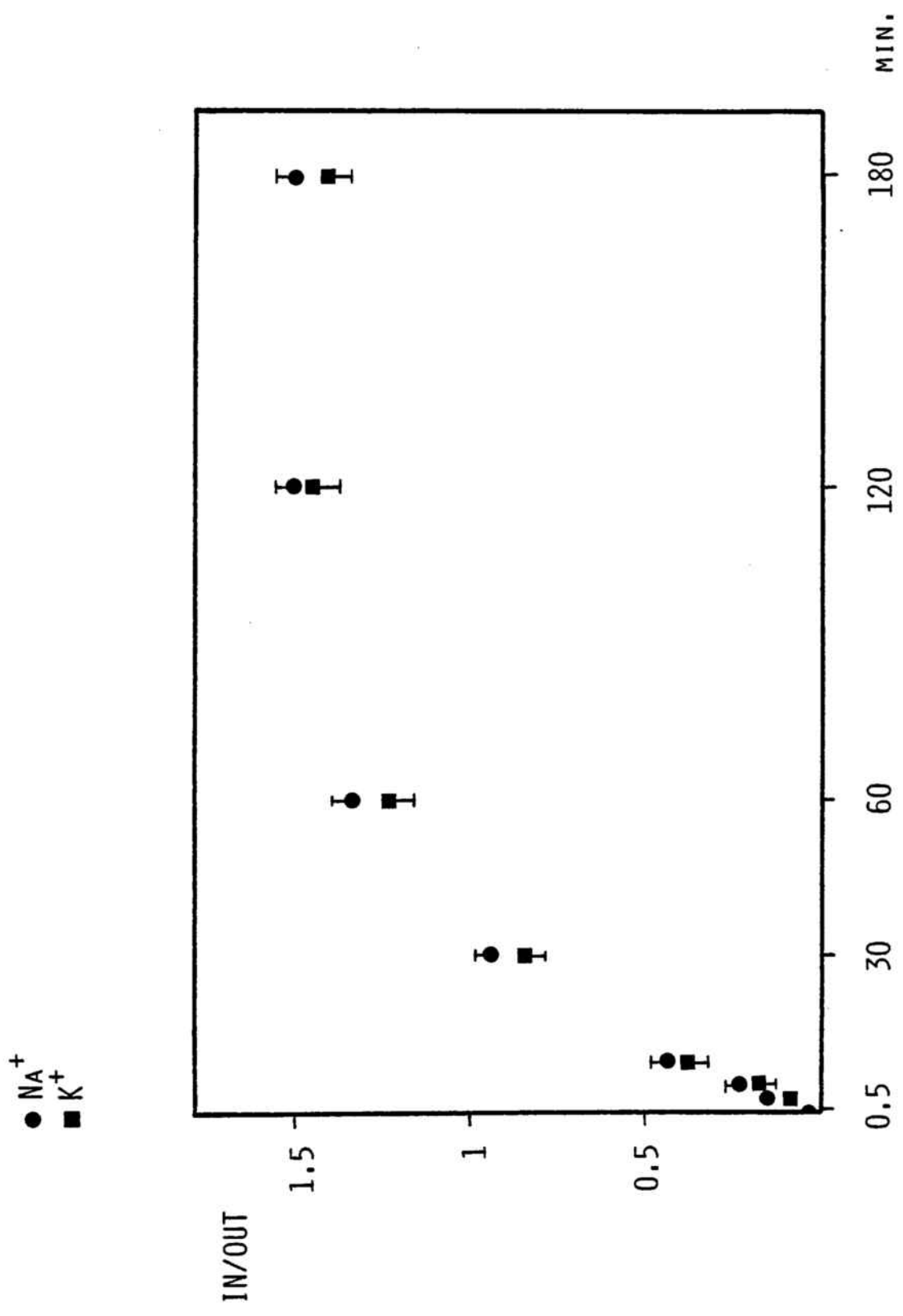
En la taula IV.2.5 es mostren les inhibicions produïdes per diferents aminoàcids (concentració 10 mM, glutamat 3 mM) sobre el transport de L-leucina (concentració 0.01 mM) a 37 C i 0.5 minuts d'incubació. L-prolina, AIB, L-arginina, L-treonina, β -alanina, sarcosina, L-fenilalanina, L-serina, D-alanina, L-histidina i L-triptofan inhibeixen significativament el transport de L-leucina, mentre que D-leucina, glicina, L-glutamina, L-isoleucina, L-metionina, L-lisina, L-alanina, L-glutamat i L-valina no tenen cap efecte.

IV.2.5. Transport de L-glutamina.

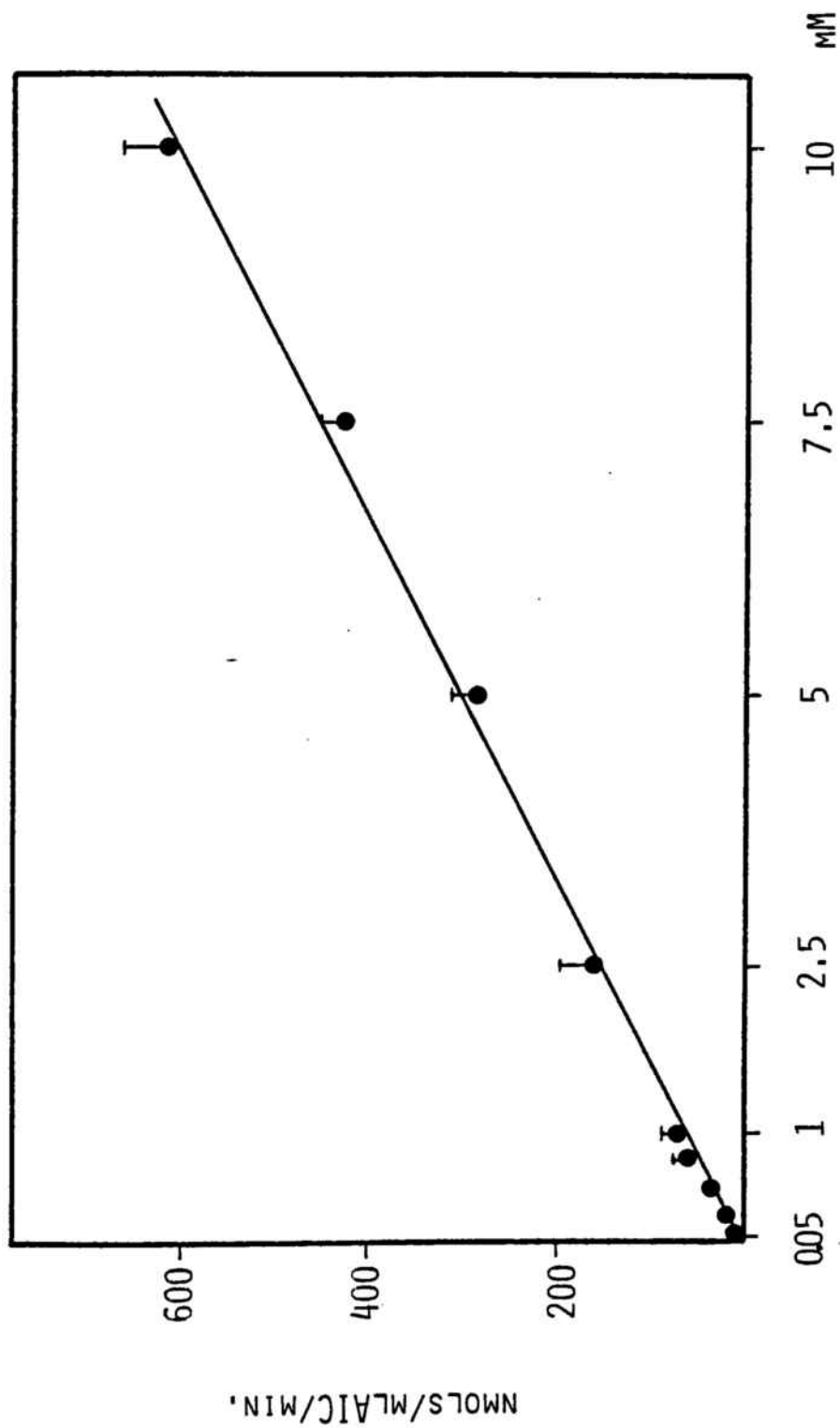
En la gràfica IV.2.13 es mostra la captació de L-glutamina en funció del temps en presència i absència de sodi mesurada a 37 C i a una concentració inicial de L-glutamina de 0.2 mM. Com es pot observar, la captació de L-glutamina és linial amb el temps fins a 30 minuts d'incubació. L'equilibració apareix als 120 minuts assolint-se una relació IN/OUT de 1.5 en aquell moment, independentment a la presència ó absència de sodi en el medi.

En la gràfica IV.2.14 es mostra la cinètica del transport de L-glutamina en eritròcits mesurada a 37 C i 4 minuts d'incubació, en un marge de concentracions de 0.05 a 10 mM. Com es pot observar, el transport és linial amb la concentració sense detectar-se saturació, i trobant-se un coeficient de correlació de 0.998 i una Kd de 0.059 min^{-1} .

GRAFICA IV.2.13. CAPTACIO DE 14-C GLUTAMINA PER ERITROCITS. (37°C, 0.2 MM).



GRAFICA IV.2.14. CINÉTICA DEL TRANSPORT DE 14-C GLUTAMINA EN ERITROCITS. (37°C, 4 MIN).



IV.2.6. Transport de L-prolina.

En la gràfica IV.2.15 es mostra la captació de L-prolina en funció del temps mesurada a 37 C i a una concentració inicial de L-prolina en el medi de 0.1 mM, en presència i absència de sodi. Com es pot observar, independentment de la presència de sodi la captació és linial fins als 10 minuts d'incubació quan assoleix la màxima relació IN/OUT de 1.4 la qual tendeix a disminuir equilibrant-se finalment als 120 minuts en una relació de 1.2.

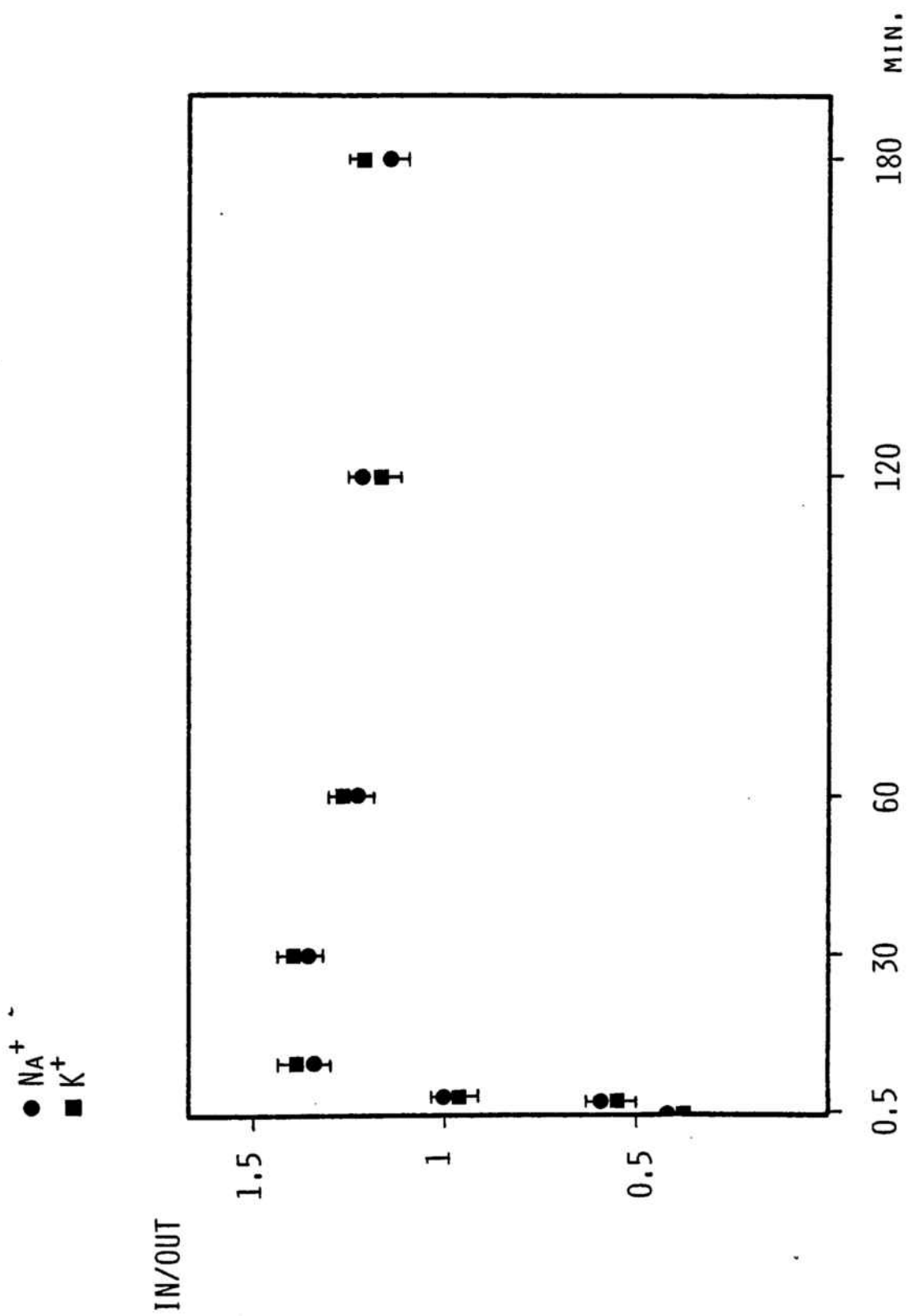
La cinètica del transport de L-prolina en eritròcits es mostra en la gràfica IV.2.16 i ha estat mesurada a 37 C i 0.5 minuts d'incubació, en un marge de concentracions de 0.1 a 10 mM. Com es pot observar, la cinètica és linial sense indicis de saturació, obtenint-se un coeficient de correlació de 0.998 i una Kd de 0.718 min^{-1} .

IV.2.7. Transport de L-lisina.

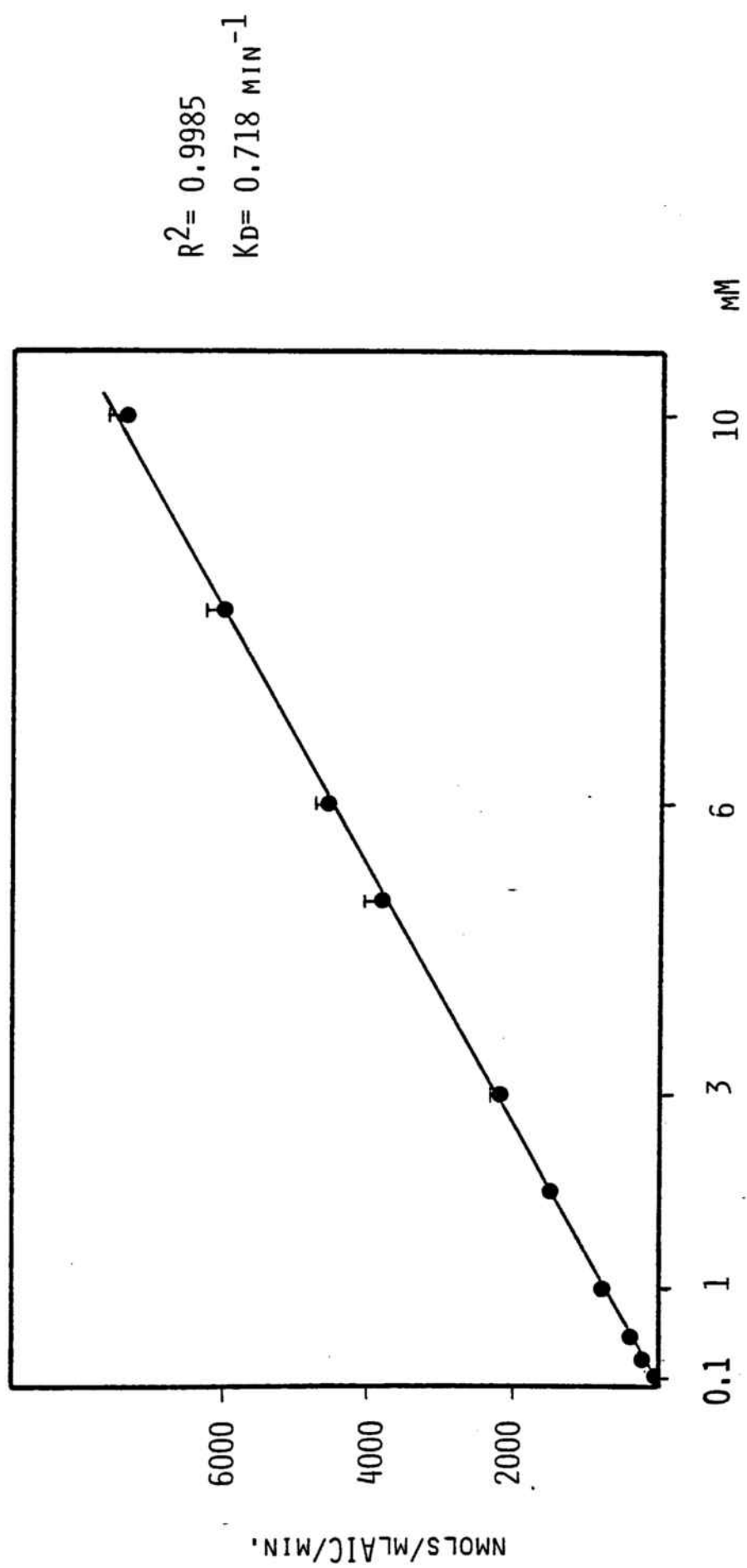
En la gràfica IV.2.17 es mostra la captació de L-lisina en funció del temps i en presència i absència de sodi, a 37 C i a una concentració inicial de L-lisina en el medi de 0.1 mM. No es veuen diferències en la captació degudes a la presència de sodi i a la seva absència. La captació és linial en els 10 primers minuts d'incubació i s'equilibra als 120 minuts assolint una relació IN/OUT de 1.

En la gràfica IV.2.18 es mostra la cinètica del transport de L-lisina en eritròcits mesurada a 37 C i 1 minut d'incubació, en un marge de concentracions de 0.01 a 2 mM. Com es pot observar, la cinètica és linial sense indicis de saturació, obtenint-se un coeficient de correlació de 0.997 i una Kd de 0.191 min^{-1} .

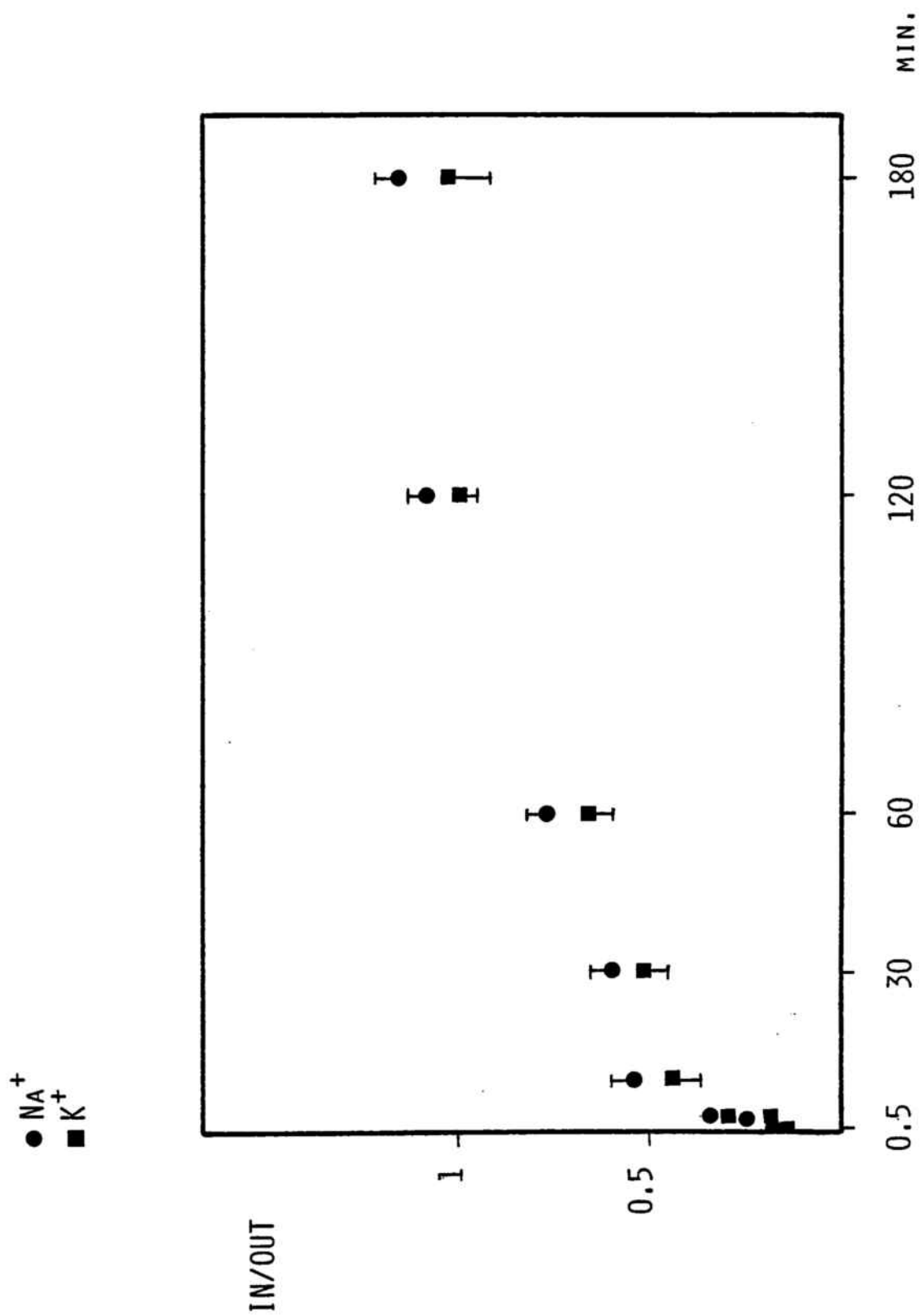
GRAFICA IV.2.15. CAPTACIO DE 3-H PROLINA PER ERITROCITS. (37°C, 0.1 MM).



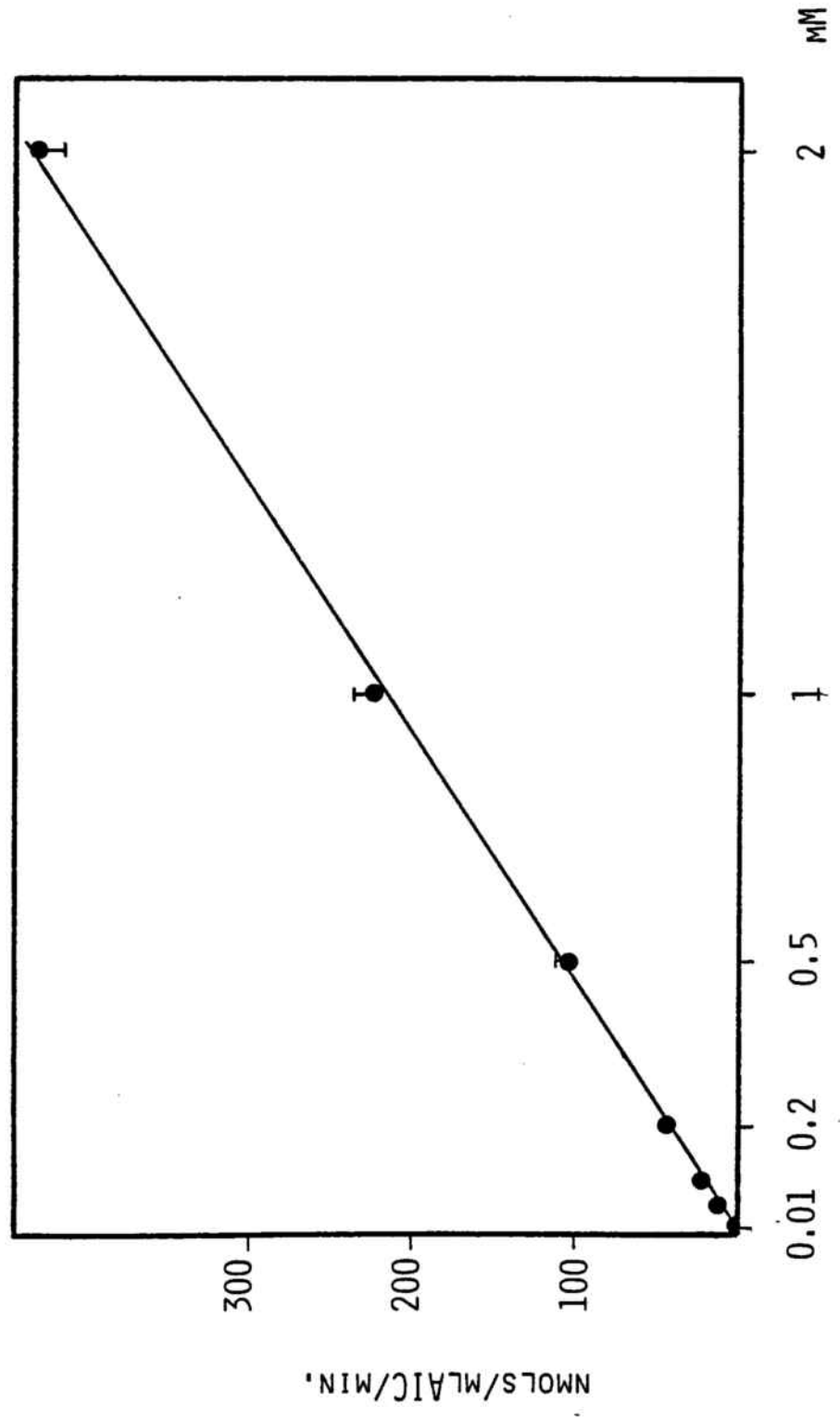
GRAFICA IV.2.16. CINETICA DEL TRANSPORT DE 3-H PROLINA EN ERITROCITS. (37°C, 0.5 MIN).



GRAFICA IV.2.17. CAPTACIO DE 3-H LISINA PER ERITROCITS. (37°C, 0.1 mM).



GRAFICA IV.2.18. CINETICA DEL TRANSPORT DE 3-H LISINA EN ERITROCITS. (37°C, 1 MIN).



$$R^2 = 0.9967$$

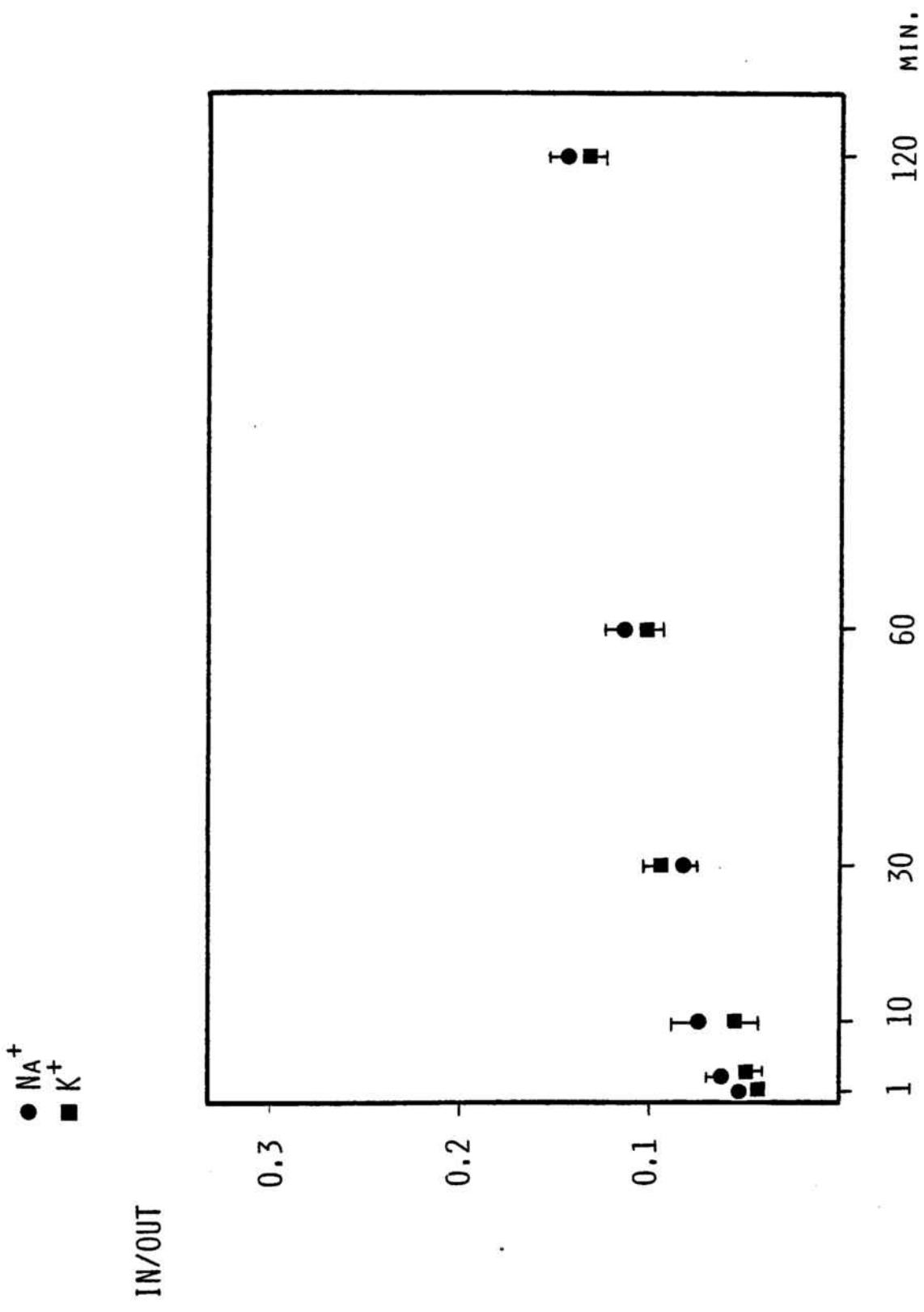
$$K_D = 0.191 \text{ MIN}^{-1}$$

IV.2.8. Transport de L-glutamat.

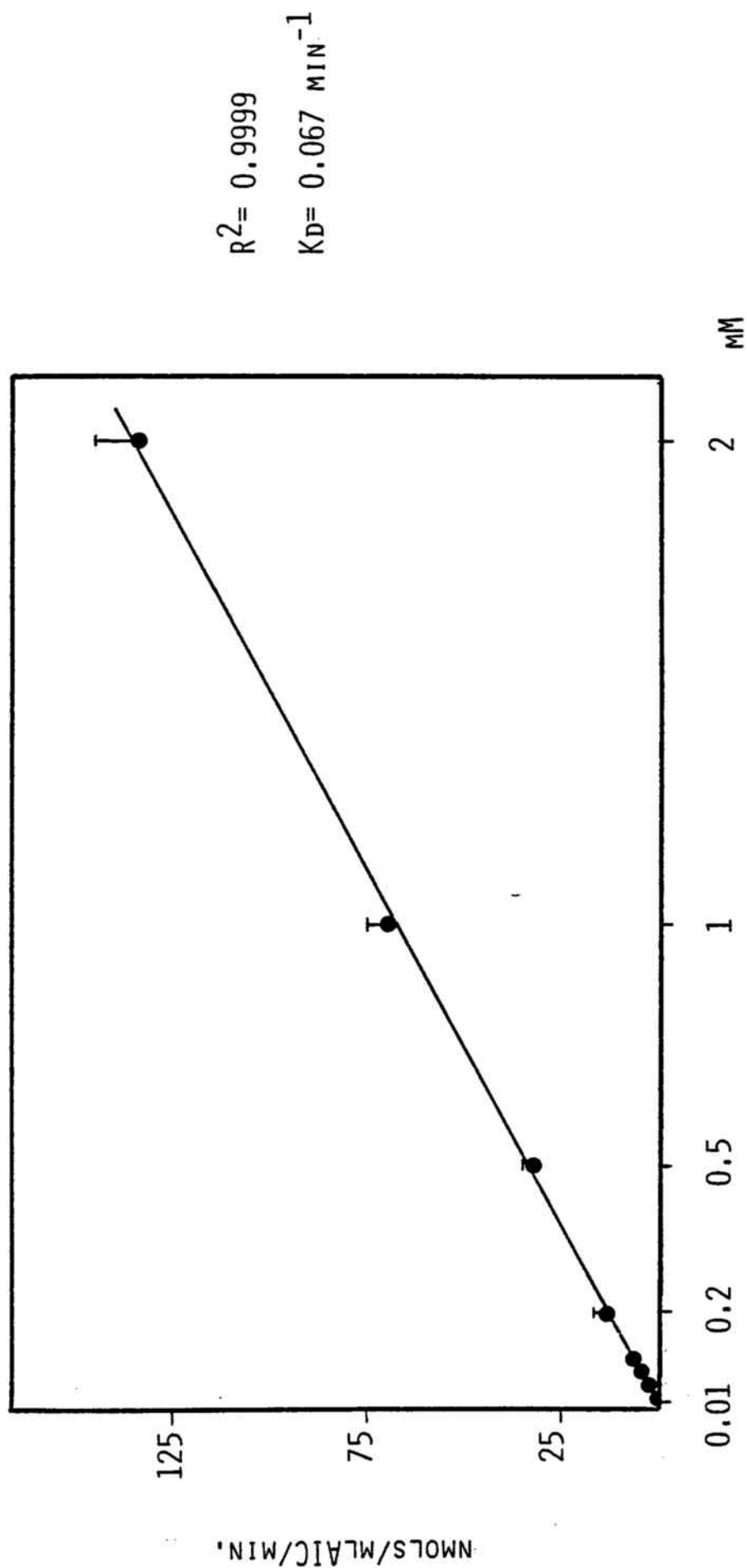
En la gràfica IV.2.19 es mostra la captació de L-glutamat en funció del temps, en presència i absència de sodi, a 37 C i a una concentració inicial de L-glutamat en el medi de 0.2 mM. Com es pot comprovar, la captació de L-glutamat per eritròcits és molt lenta assolint-se als 120 minuts d'incubació una relació de 0.12, i no mostrant indicis d'equilibració en aquest temps.

En la gràfica IV.2.20 es mostra la cinètica del transport de L-glutamat per eritròcits mesurada a 37 C i 1 minut d'incubació, en un marge de concentracions de 0.01 a 2 mM. Com es pot observar, la captació de L-glutamat és linial amb la concentració, no detectant-se indicis de saturació i obtenit-se un coeficient de correlació de 0.999 i una kd de 0.067 min^{-1} .

GRAFICA IV.2.19. CAPTACIO DE 14-C GLUTAMAT PER ERITROCITS. (37°C, 0.2 MM).



GRAFICA IV.2.20. CINETICA DEL TRANSPORT DE $^{14}\text{-C}$ GLUTAMAT EN ERITROCITS. (37°C, 1 MIN).



IV.3. PART 3: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN RETICULÒCITS "IN VITRO"

IV.3.1. Obtenció de reticulòcits i nivells d'ATP intracel.lular durant els rentats i incubació.

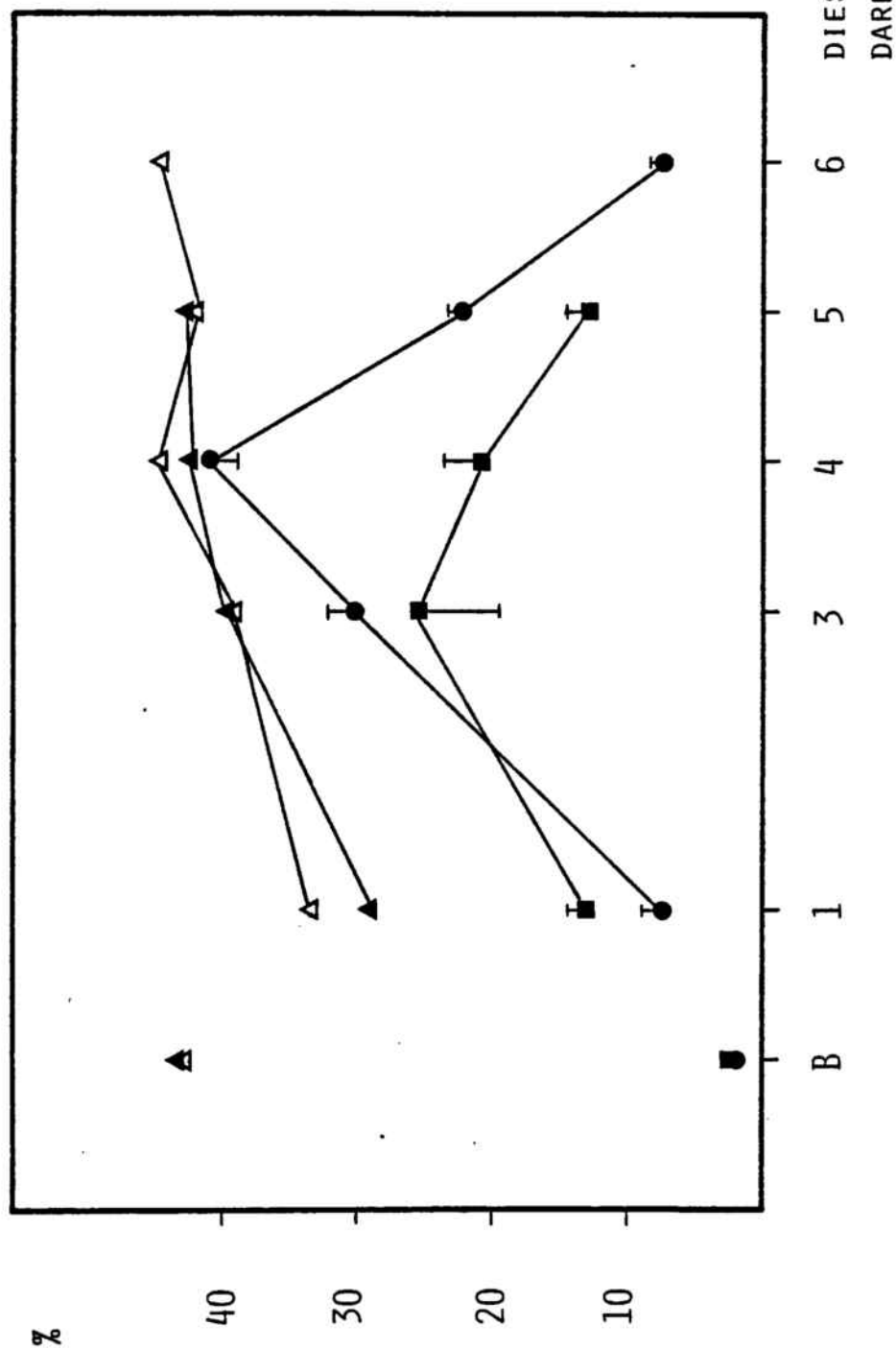
En la gràfica IV.3.1 es mostra l'evolució de l'hematòcrit i del percentatge de reticulòcits després de la darrera extracció de sang en dos grups que difereixen en els dies durant els que s'ha extret sang (un grup: 3 dies, l'altre: 4 dies). Com es pot observar, el grup de rates a les que s'extreïé sang durant 3 dies mostren un pic de reticulòcits més gran, arribant a ésser del 40% el quart dia després de la darrera extracció de sang. En el grup de 4 dies d'extracció el pic és molt més petit i apareix un dia abans que en el primer grup. L'hematòcrit disminueix més en el grup de l'extracció de 3 dies, arribant a un 26% el primer dia després de la darrera extracció de sang, i es va recuperant durant els següents 6 dies.

En la gràfica IV.3.2 es mostra l'evolució de la concentració intracel.lular d'ATP durant els processos de rentat i d'incubació dels reticulòcits. Com es pot observar, no hi ha canvis significatius fins a 2 hores d'incubació.

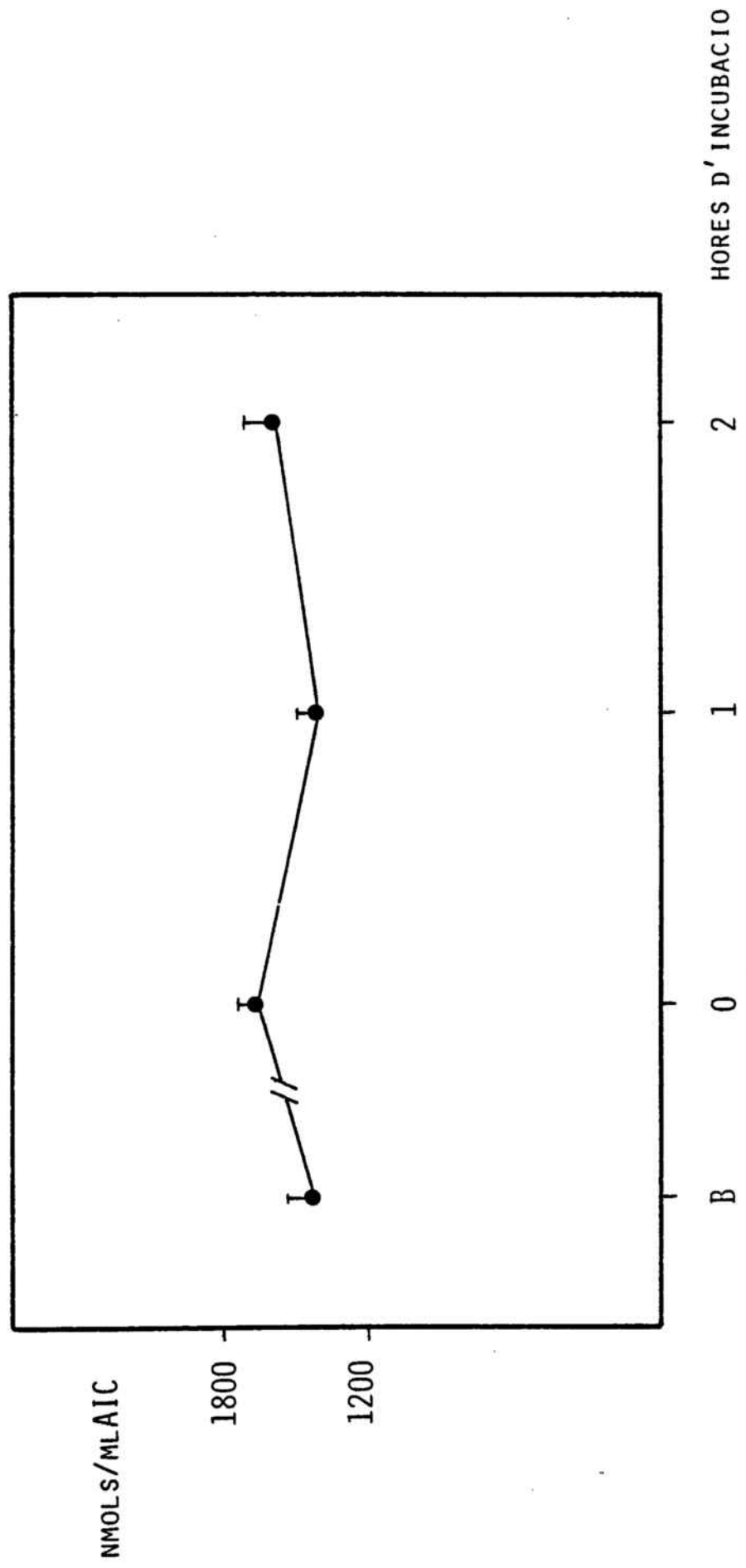
IV.3.2. Transport de L-alanina.

En la gràfica IV.3.3 es mostra la captació en funció del temps de L-alanina en una suspensió cel.lular amb un 42% de reticulòcits, mesurada a 37 C i a una concentració inicial en el medi de L-alanina de 0.2 mM, en presència i en absència de sodi. Com es pot observar existeix una gran diferència en la captació de L-alanina segons la presència de sodi. En absència de sodi, la captació de L-alanina arriba a equilibrar-se als 30 minuts d'incubació, assolint

GRAFICA IV.3.1.1. EVOLUCIO DE L'HEMATOCRIT I DEL PERCENTATGE DE RETICULOCITS DESPRES DE LA DARRERA EXTRACCIO DE SANG. ▲ HCT EXTRACCIO DE SANG DURANT 3 DIES, △ HCT EXTRACCIO DE SANG DURANT 4 DIES, ● %RETICULOCITS (3 DIES), ■ %RETICULOCITS (4 DIES).



GRAFICA IV.3.2. CONCENTRACIO D'ATP INTRACEL·LULAR DURANT ELS PROCESSOS DE RENTAT I D'INCUBACIO EN RETICULOCITS



una relació de concentracions dins i fora de les cèl.lules (IN/OUT) de 1. En presència de sodi , hi ha una acumulació de L-alanina intracel.lular als 10 minuts d'incubació, assolint una relació IN/OUT de 1.7 als 30 minuts d'incubació, estabilitzant-se posteriorment a 1.5.

En la gràfica IV.3.4 es mostra la cinètica del transport de L-alanina en una suspensió cel.lular amb un 41% de reticulòcits, mesurada a 37 C i a 1 minut d'incubació, en presència i en absència de sodi (presència de potassi). En absència de sodi el transport de L-alanina és linial amb la concentració sense indicis de saturació, amb un coeficient de correlació de 0.998 i una Kd de 0.112 min^{-1} . El component dependent de sodi del transport de L-alanina presenta una cinètica saturable amb una $V_{m\grave{a}x.}$ de $98.35 \text{ nmols/mlAIC/min.}$ i una K_m de 0.127 mM. Com es pot observar, el component dependent de sodi és molt superior al component independent de sodi a concentracions d'alanina per sota de 0.5 mM. A una concentració d'alanina de 1 mM, el component independent de sodi supera al component dependent de sodi.

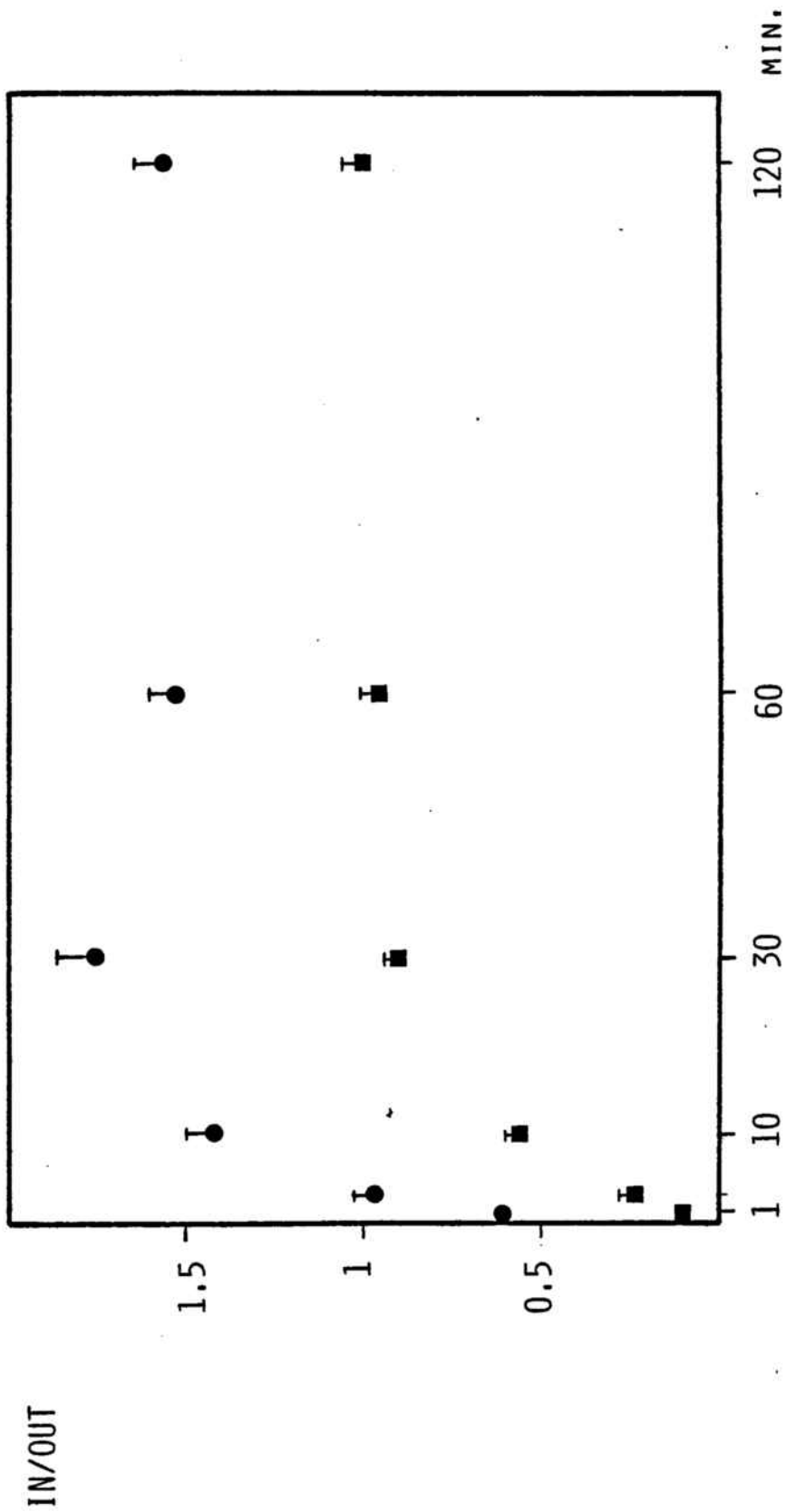
La linialització del transport d'alanina dependent de sodi es mostra en la gràfica IV.3.5. Només hi ha evidència per un únic component amb un coeficient de correlació de 0.946.

En la taula IV.3.1 es mostren les inhibicions del transport de L-alanina a una concentració de 0.01 mM produïdes per diferents aminoàcids a una concentració de 10 mM. , mesurades a 37 C i a 1 minut en presència i absència de sodi. Com es pot observar, la glicina, L-serina i L-glutamina inhibeixen de forma significativa tant el transport d'alanina en presència com en absència de sodi. El Me-AIB no produeix cap efecte.

GRAFICA IV.3.3. CAPTACIO DE 14-C ALANINA PER RETICULOCITS (37°C, 0.2 MM).

(RETICULOCITS:42%)

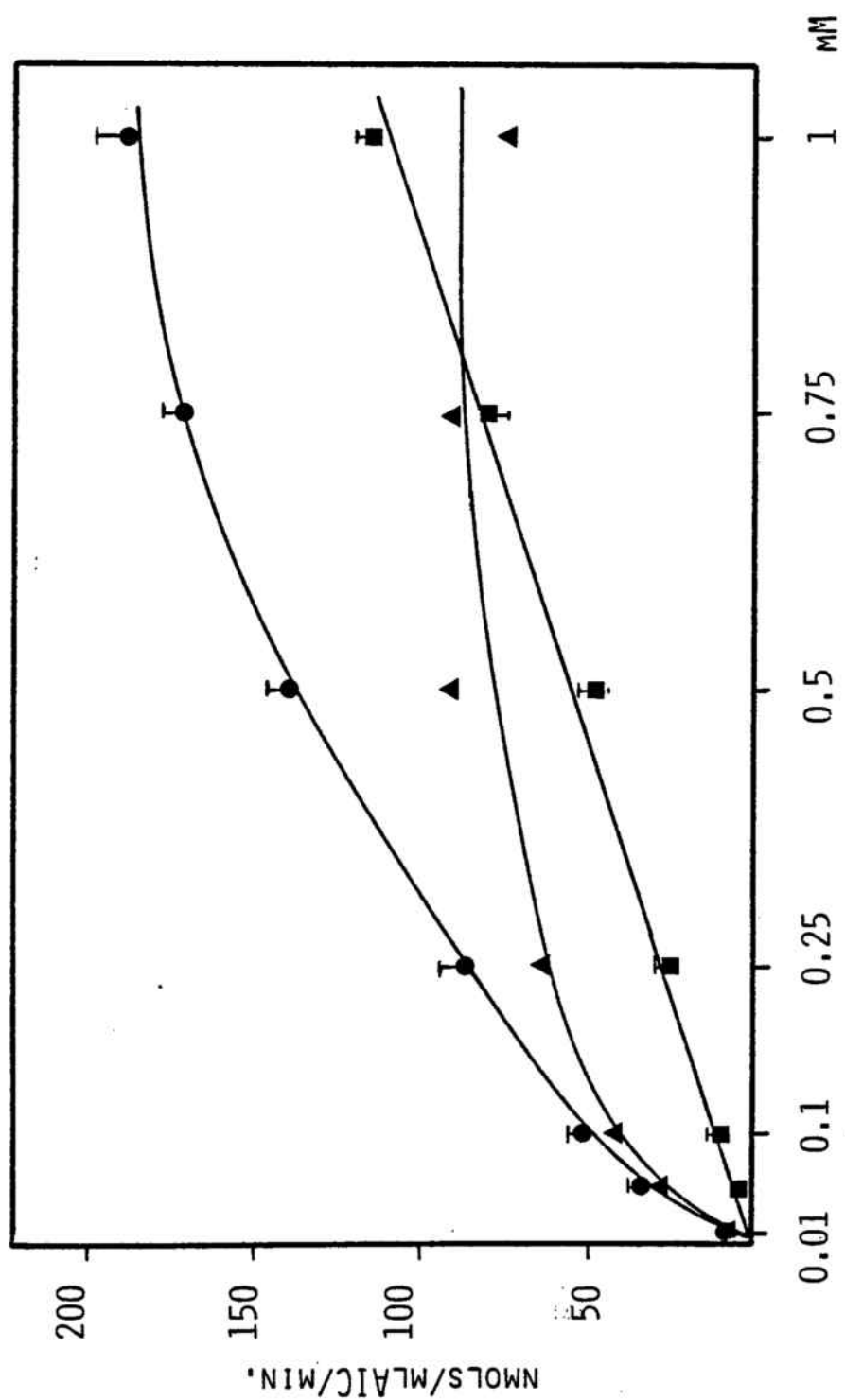
● Na⁺
■ K⁺



GRAFICA IV.3.4. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-C ALANINA EN RETICULOCITS. (37°C, 1 MIN).

(RETICULOCITS:41%)

- Na^+
- K^+
- ▲ $Na^+ - K^+$



COMPONENT K^+

$R^2 = 0.998$

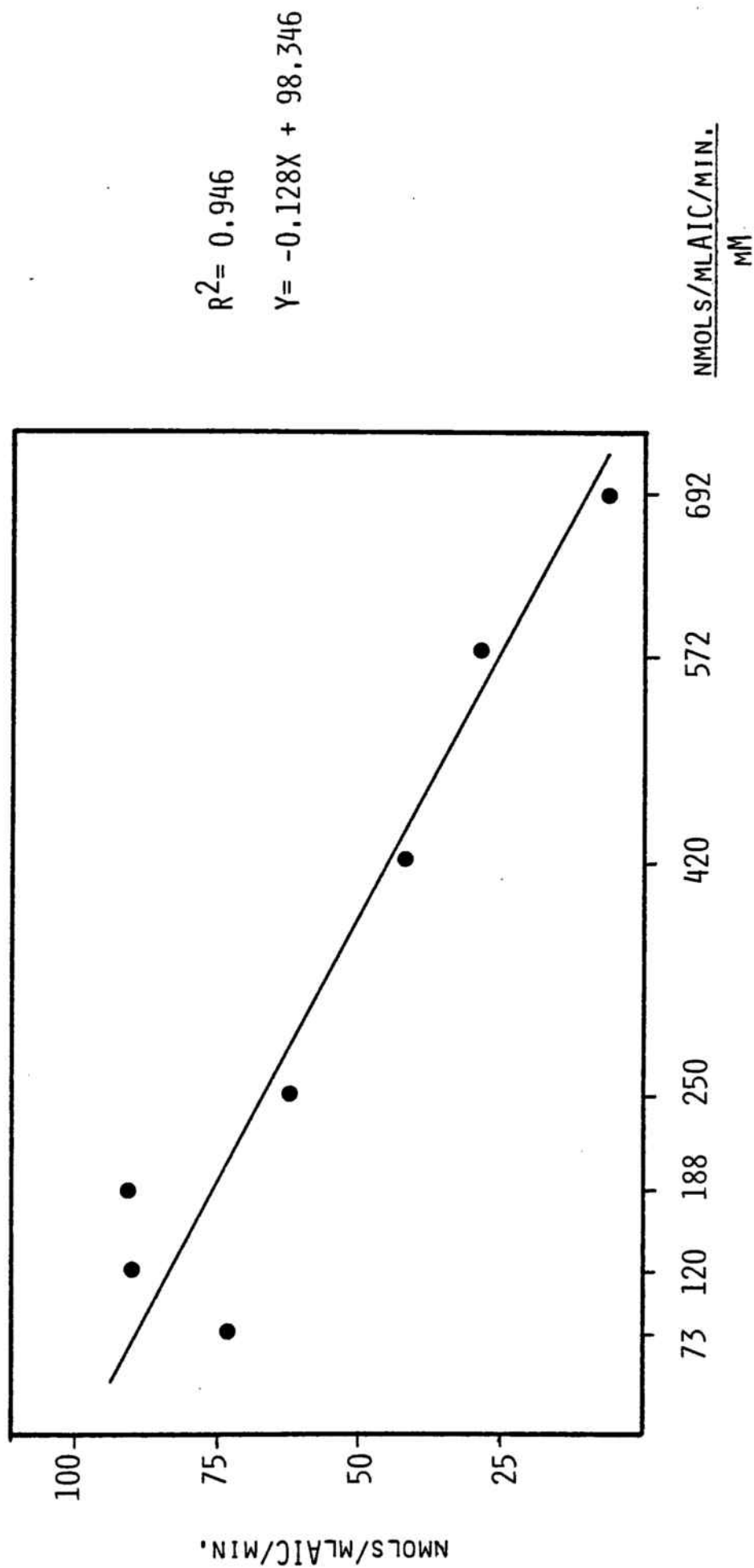
$K_D = 0.112 \text{ MIN}^{-1}$

COMPONENT $Na^+ - K^+$

$V_{MAX} = 98.35 \text{ NMOLS/MLAIC/MIN.}$

$K_M = 0.127 \text{ mM}$

GRAFICA IV.3.5. LINEALITZACIO DEL TRANSPORT DEPENDENT DE Na^+ DE $^{14}\text{-C}$ ALANINA EN RETICULOCITS.
(37°C , 1 MIN).



TAULA IV.3.1. INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE L-ALANINA EN
RETICULÒCITS.

Inicial: Na^+ :4.71 nmols/mlAIC/min. K^+ :0.9. Na^+-K^+ :3.81

Alanina basal 0.01 mM. Inhibidors 10 mM.

Valors: % del transport basal (sense inhibidors).

Incubacions 1 min. 37 C. Reticulòcits:40%

<u>INHIBIDOR</u>	<u>Na⁺</u>	<u>K⁺</u>	<u>Na⁺-K⁺</u>
Gly	33.1± 0.9 ***	61.1± 1.1 ***	26.5
L-Ser	14.7± 2.6 ***	55.6± 0.6 ***	4.9
L-Gln	25.4± 0.6 ***	70.3± 1.8 ***	27.6
MeAIB	99.4± 1.1 ns	80.0± 5.6 ns	103.9

Estadística: *** $p < 0.001$ respecte al transport d'alanina basal (sense inhibidor).

IV.3.3. Transport de glicina.

En la gràfica IV.3.6 es mostra la captació de glicina en funció del temps d'una suspensió cel.lular amb un 41% de reticulòcits a 37 C i a una concentració inicial de glicina en el medi de 0.05 mM, en presència i absència de sodi. En absència de sodi la captació de glicina arriba a assolir una relació IN/OUT de 1 entre els 60 i 120 minuts d'incubació, començant-se a equilibrar a partir dels 30 minuts. En presència de sodi existeix una gran capacitat acumulativa, arribant a una relació IN/OUT de 2.9 a partir dels 60 minuts d'incubació, equilibrant-se en 30 minuts d'incubació.

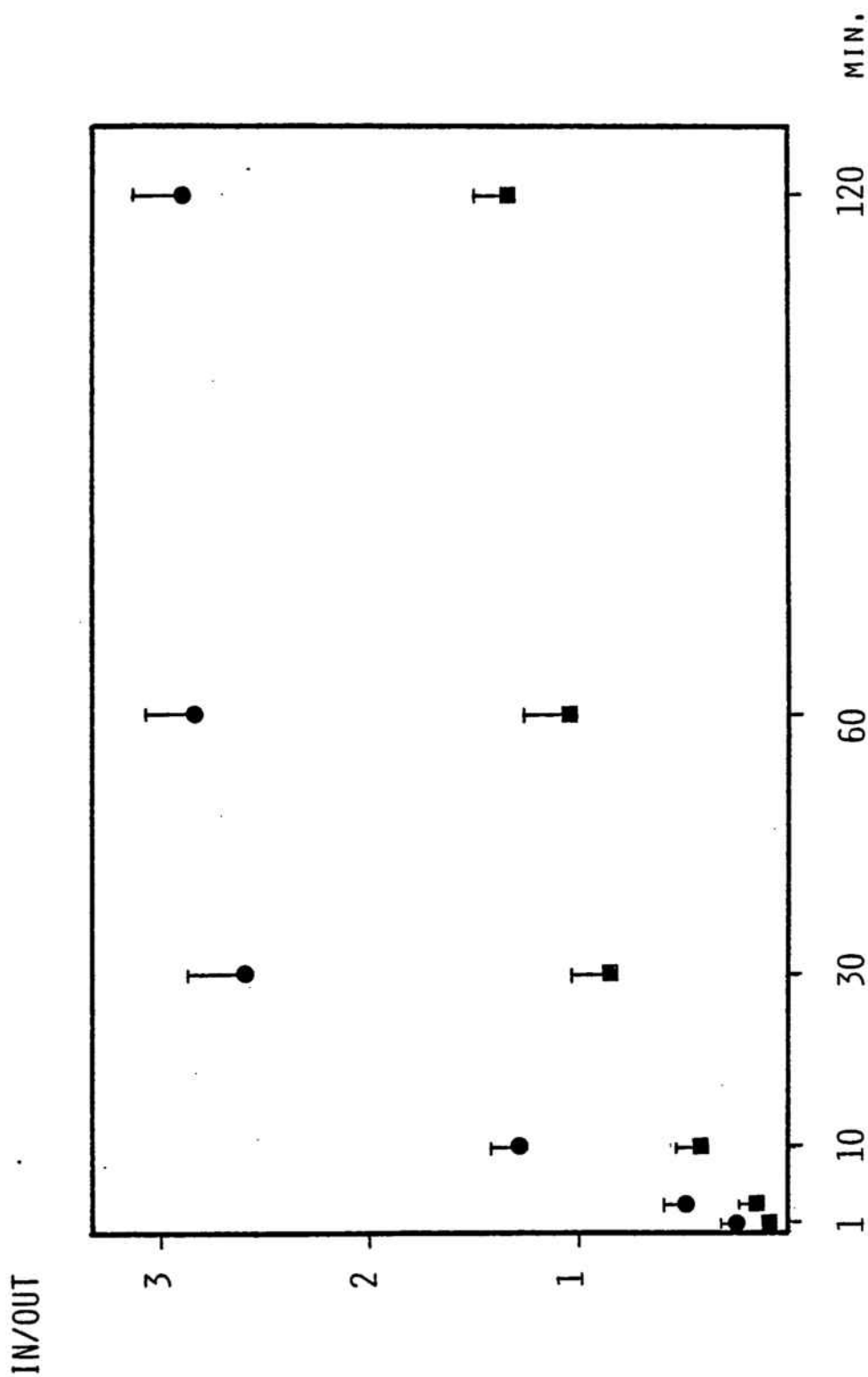
En la gràfica IV.3.7 es mostra el transport de glicina en funció de la concentració (entre 0.01 i 1 mM) d'una suspensió cel.lular amb un 42% de reticulòcits, mesurada a 37 C i 2 minuts d'incubació, en presència i absència de sodi. En absència de sodi el transport de glicina és linial amb la concentració amb un coeficient de correlació de 0.973 i una K_d de 0.0516 min^{-1} . El component dependent de sodi del transport de glicina segueix una cinètica saturable amb una $V_{m\grave{a}x.}$ de $93.7 \text{ nmols/mlAIC/min.}$ i una K_m de 0.136 mM. Com es pot observar, a concentracions per desota de 0.25 mM de glicina pràcticament tot el transport de glicina és dependent de sodi.

La linialització del transport de glicina dependent de sodi es mostra en la gràfica IV.3.8. Com es pot observar, existeix un únic component amb un coeficient de correlació de 0.954.

En la taula IV.3.2 es mostra la inhibició que produeixen diferents aminoàcids a una concentració de 10 mM sobre el transport de glicina a una concentració de 0.01 mM , en presència i absència de sodi, mesurat a 37 C i 1 minut

GRAFICA IV.3.6. CAPTACIO DE 14-C GLICINA PER RETICULOCITS. (37°C, 0.05 MM).

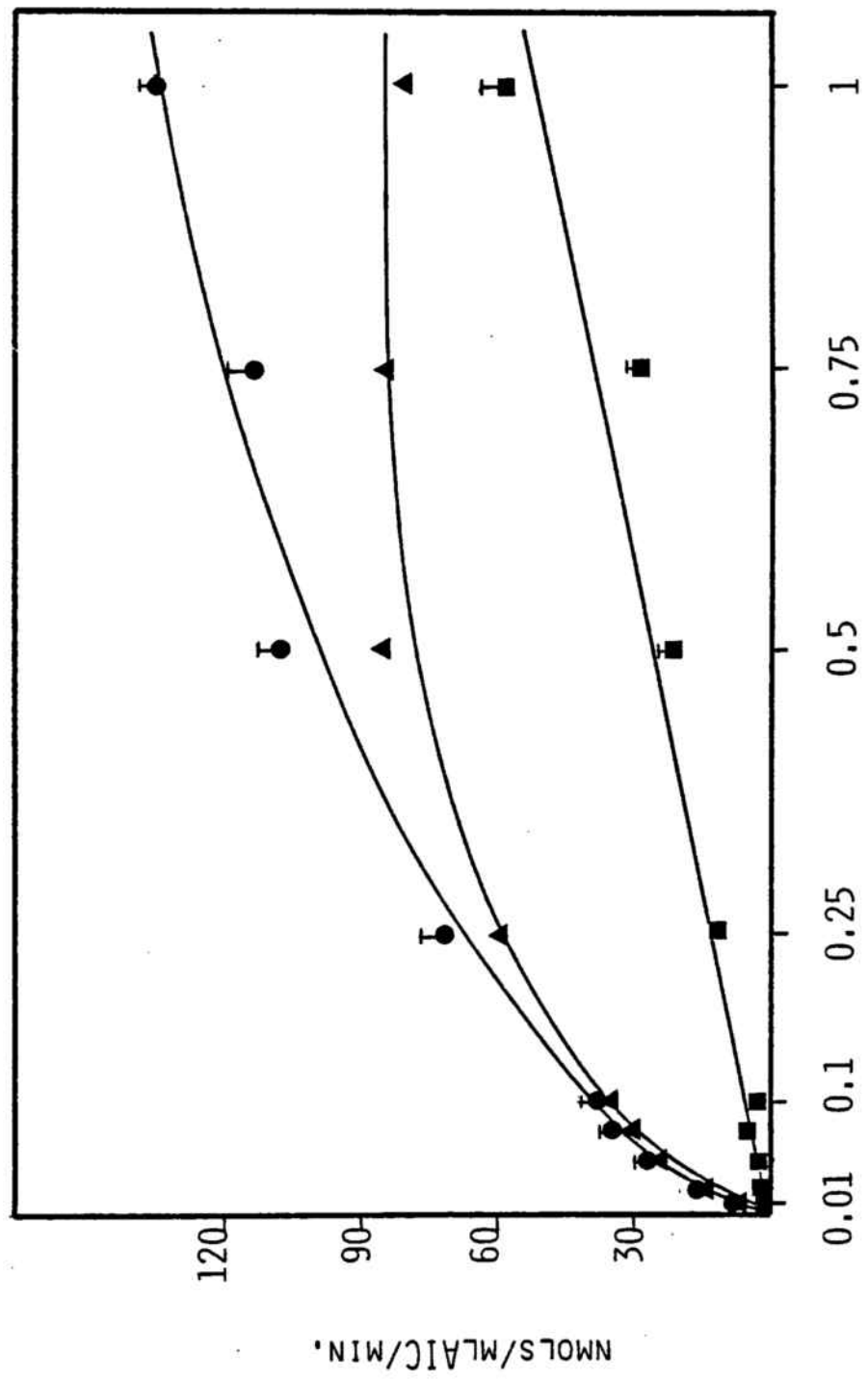
● Na⁺
■ K⁺
(RETICULOCITS:41%)



GRAFICA IV.3.7. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-GLICINA EN RETICULOCITS. (37°C, 2 MIN).

(RETICULOCITS:42%)

- Na^+
- K^+
- ▲ $Na^+ - K^+$



COMPONENT K^+

$R^2 = 0.973$

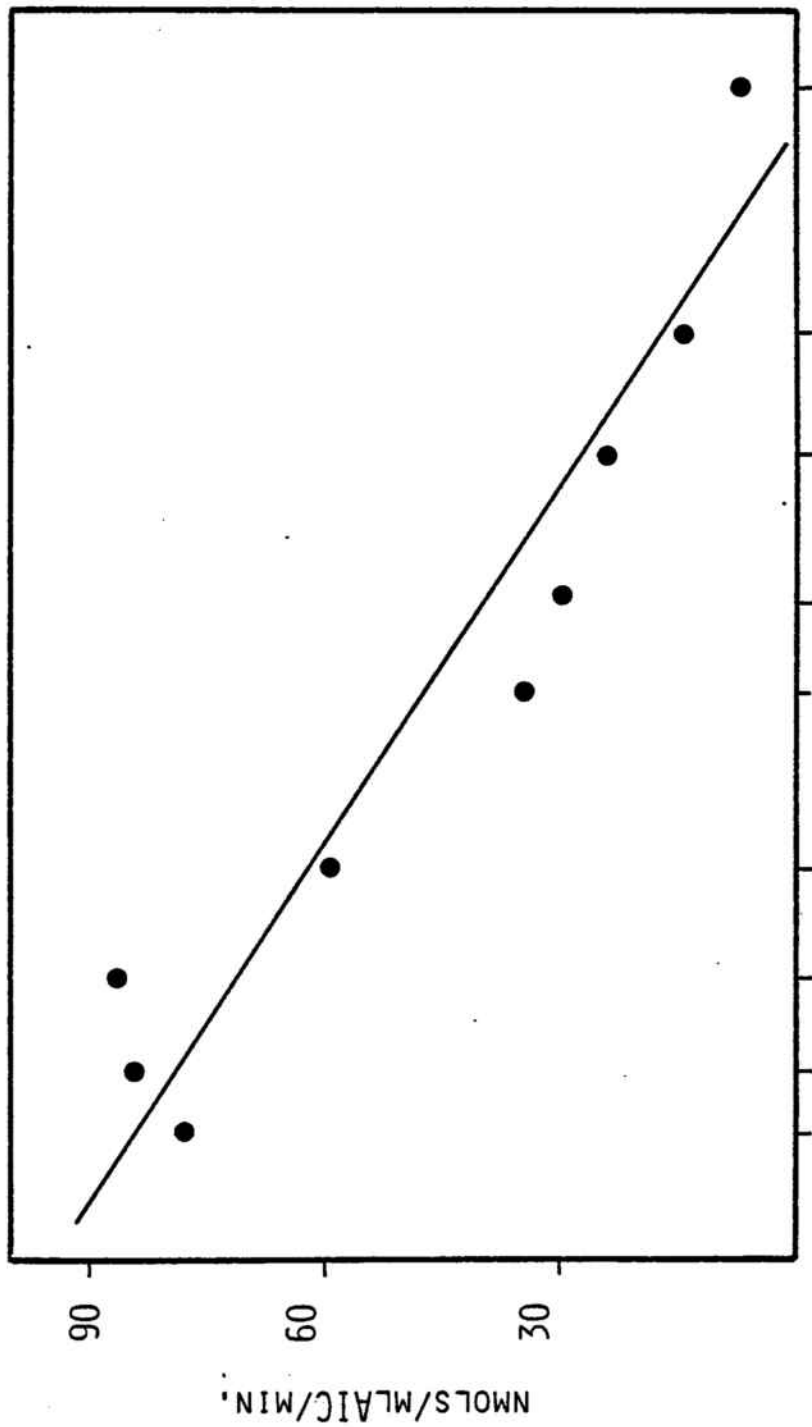
$K_D = 0.0516 \text{ MIN}^{-1}$

COMPONENT $Na^+ - K^+$

$V_{MAX} = 93.7 \text{ NMOLS/MLAIC/MIN}$

$K_M = 0.136 \text{ mM}$

GRAFICA IV.3.8. LINIALITZACIO DEL TRANSPORT DEPENDENT DE Na^+ DE GLICINA EN RETICULOCITS.
(37°C, 2 MIN).



$$R^2 = 0.954$$

$$Y = -0.136X + 93.7$$

TAULA IV.3.2. INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE GLICINA EN RETICULÒCITS.

Inicial: Na^+ :4.6 nmols/mlAIC/min. K^+ :0.43. Na^+-K^+ :4.17

Glicina basal: 0.01 mM. Inhibidors: 10 mM.

Valors: % del transport basal (sense inhibidor).

Incubació 1 min. a 37 C. Reticulòcits: 40%

<u>INHIBIDOR</u>	<u>Na⁺</u>	<u>K⁺</u>	<u>Na⁺-K⁺</u>
L-Ala	87.0±7.4 ns	67.4±4.7 **	89.0
Sarcosina	19.7±1.1 ***	88.3±2.3 ns	12.7
MeAIB	95.9±9.4 ns	93.0±4.7 ns	96.3

Estadística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte al transport basal de glicina (sense inhibidor).

TAULA IV.3.3. DEPENDÈNCIA AL Cl^- DEL TRANSPORT DEPENDENT DE Na^+ DE GLICINA EN RETICULÒCITS.

Reticulocits: 40%.

Concentració de glicina 0.1 mM. Temps d'incubació 1 min. a 37 C.

Resultats de la captació en nmols/mlAIC/min.

<u>ANIO</u>	<u>CAPTACIO</u>	<u>%INHIBICIO</u>
Clorur	52.69±3.65	-
Formiat	21.43±1.17 ***	59.33
Acetat	19.57±1.37 ***	62.86

Estadística: *** $p < 0.001$ respecte la captació amb l'anió clorur.

d'incubació. Com es pot observar, la L-alanina inhibeix de forma significativa el transport de glicina només en absència de sodi, mentre que la sarcosina inhibeix el transport de glicina només en presència de sodi. El Me-AIB no té cap efecte.

En la taula IV.3.3 es mostra la dependència al Cl^- del transport de glicina dependent de sodi en una suspensió cel.lular amb un 40% de reticulòcits, mesurada a 37 C i 1 minut d'incubació a una concentració de glicina de 0.1 mM. Com es pot observa, la substitució del Cl^- per format o per acetat produeix una important inhibició del transport de glicina en presència de sodi.

IV.3.4. Transport de L-glutamina.

En la gràfica IV.3.9 es mostra la captació de L-glutamina en funció del temps d'una suspensió cel.lular amb un 40% de reticulòcits, mesurada a 37 C i a una concentració inicial de L-glutamina en el medi de 0.2 mM, en presència i absència de sodi. En absència de sodi la captació de L-glutamina s'equilibra a partir de 120 minuts d'incubació assolint una relació IN/OUT de 2 que es manté fins els 180 minuts d'incubació. En presència de sodi, existeix una gran capacitat d'acumular L-glutamina, equilibrant-se a partir dels 60 minuts d'incubació i assolint una relació IN/OUT de 5 que es manté fins els 180 minuts.

En la gràfica IV.3.10 es mostra el transport de L-glutamina en un marge de concentracions de 0.1 a 2 mM, d'una suspensió cel.lular amb un 41% de reticulòcits, mesurada a 37 C i a 1 minut d'incubació, en presència i absència de sodi. En absència de sodi, el transport de L-glutamina és linial amb la concentració amb un coeficient de correlació de 0.988 i una Kd de 0.135. El component dependent de sodi

presenta una cinètica saturable amb una $V_{m\grave{a}x}$ de 146.35 nmols/mlAIC/min. i una K_m de 0.390 mM. Com es pot observar, per a concentracions de L-glutamina per desota de 0.5 mM el component dependent de sodi predomina sobre l'independent. Per sobre d'aquesta concentració, predomina el component independent de sodi.

La linialització del transport de L-glutamina dependent de sodi es mostra en la gràfica IV.3.11. Com es pot observar, es detecten dos components: el component A que presenta un coeficient de correlació de 0.986 amb una $V_{m\grave{a}x}$ de 97.03 nmols/mlAIC/min. i una K_m de 0.1996 mM., i el component B que presenta un coeficient de correlació de 0.974, amb una $V_{m\grave{a}x}$ de 205.56 nmols/mlAIC/min i una K_m de 0.965 mM.

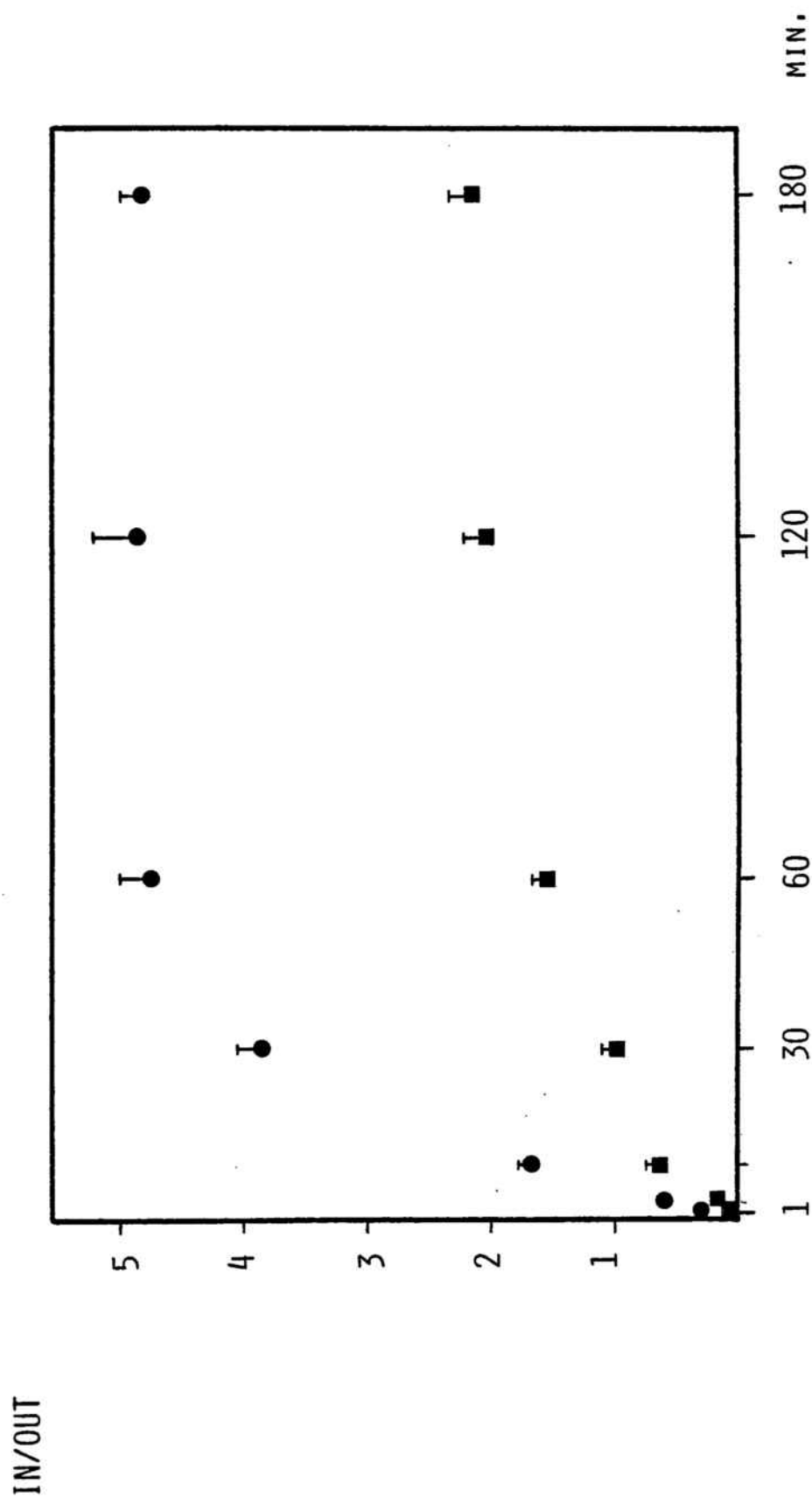
En la taula IV.3.4 es mostra la inhibició produïda per diferents aminoàcids a una concentració de 10 mM sobre el transport de L-glutamina a una concentració de 0.01 mM mesurat a 37 C i a 1 minut d'incubació en presència i absència de sodi. Com es pot observar, la L-alanina, L-histidina i la L-leucina inhibeixen el transport de L-glutamina tant en presència de sodi com en la seva absència. El Me-AIB no produeix cap inhibició.

En la taula IV.3.12 es mostra l'efecte del pH sobre el transport de L-glutamina i L-alanina en una suspensió cel.lular amb un 42% de reticulòcits, mesurat a 37 C i 1 minut d'incubació amb una concentració inicial pels dos aminoàcids de 0.1 mM, només en presència de sodi. Els resultats estan expressats en % del valor del transport mesurat a pH de 7.4. La disminució de pH produeix una inhibició del transport d'ambdós aminoàcids, però més gran per la L-glutamina, el transport de la qual s'inhibeix en un 80% a un pH de 6.5 front a una inhibició del 50% pel cas de

GRAFICA IV.3.9. CAPTACIO DE 14-C GLUTAMINA PER RETICULOCITS. (37°C, 0.2 MM).

(RETICULOCITS: 40%)

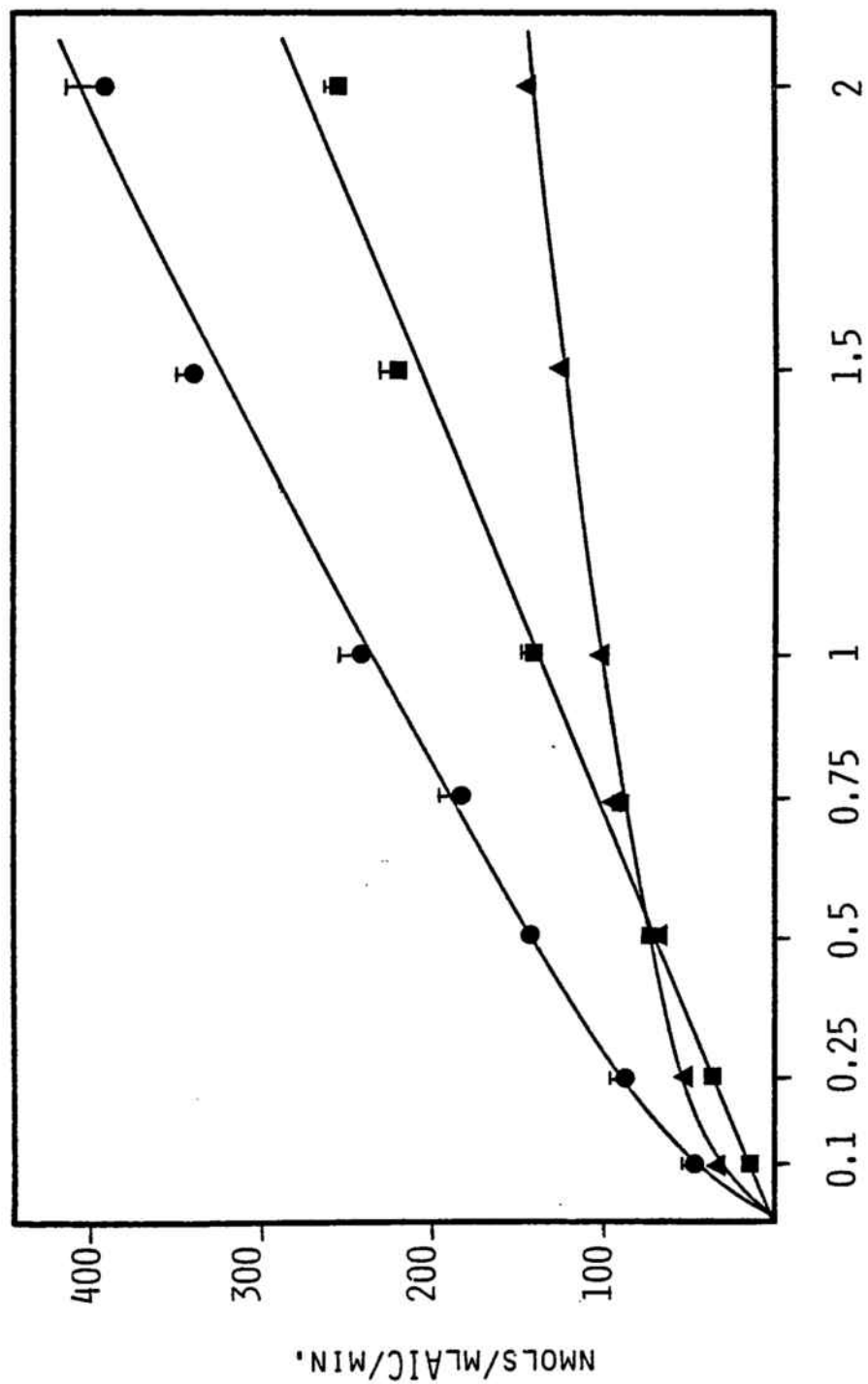
● Na⁺
■ K⁺



GRAFICA IV.3.10. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-C GLUTAMINA EN RETICULOCITS. (37°C, 1 MIN.)

(RETICULOCITS:41%)

- Na^+
- K^+
- ▲ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$



COMPONENT K^+

$R^2 = 0.988$

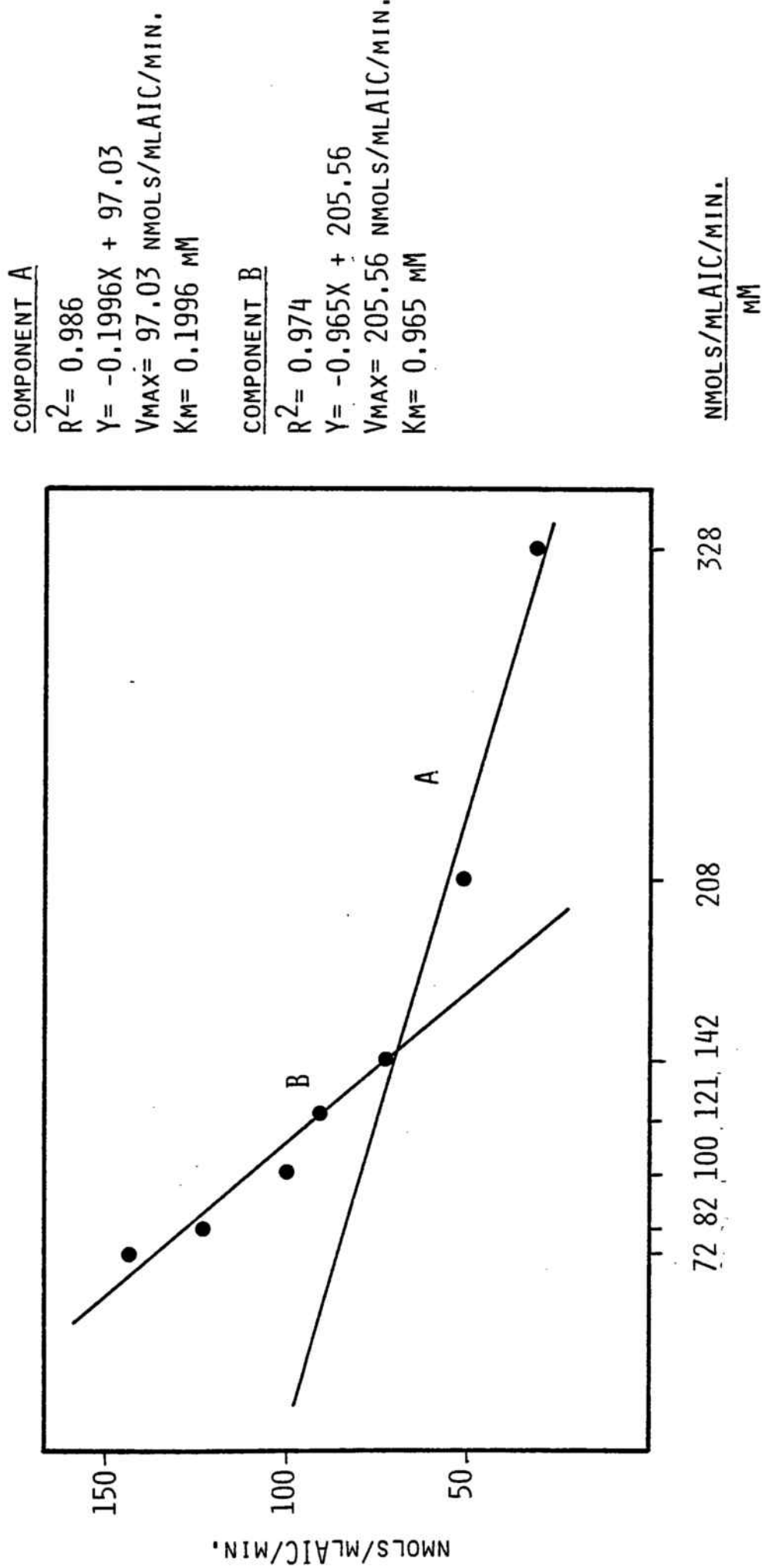
$K_D = 0.135 \text{ MIN}^{-1}$

COMPONENT $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

$V_{\text{MAX}} = 146.35 \text{ NMOL/MLAIC/MIN}$

$K_M = 0.390 \text{ mM}$

GRAFICA IV.3.11. L'INIALITZACIO DEL TRANSPORT DEPENDENT DE Na^+ DE $^{14}\text{-C}$ GLUTAMINA EN RETICULOCITS.
(37°C , 1 MIN).



TAULA IV.3.4. INHIBICIO DEL TRANSPORT DE L- GLUTAMINA EN
RETICULÒCITS.

Inicial: Na^+ :10.24 nmols/mlAIC/min. K^+ :1.4. Na^+-K^+ :8.34.

Glutamina basal: 0.01 mM. Inhibidors: 10 mM.

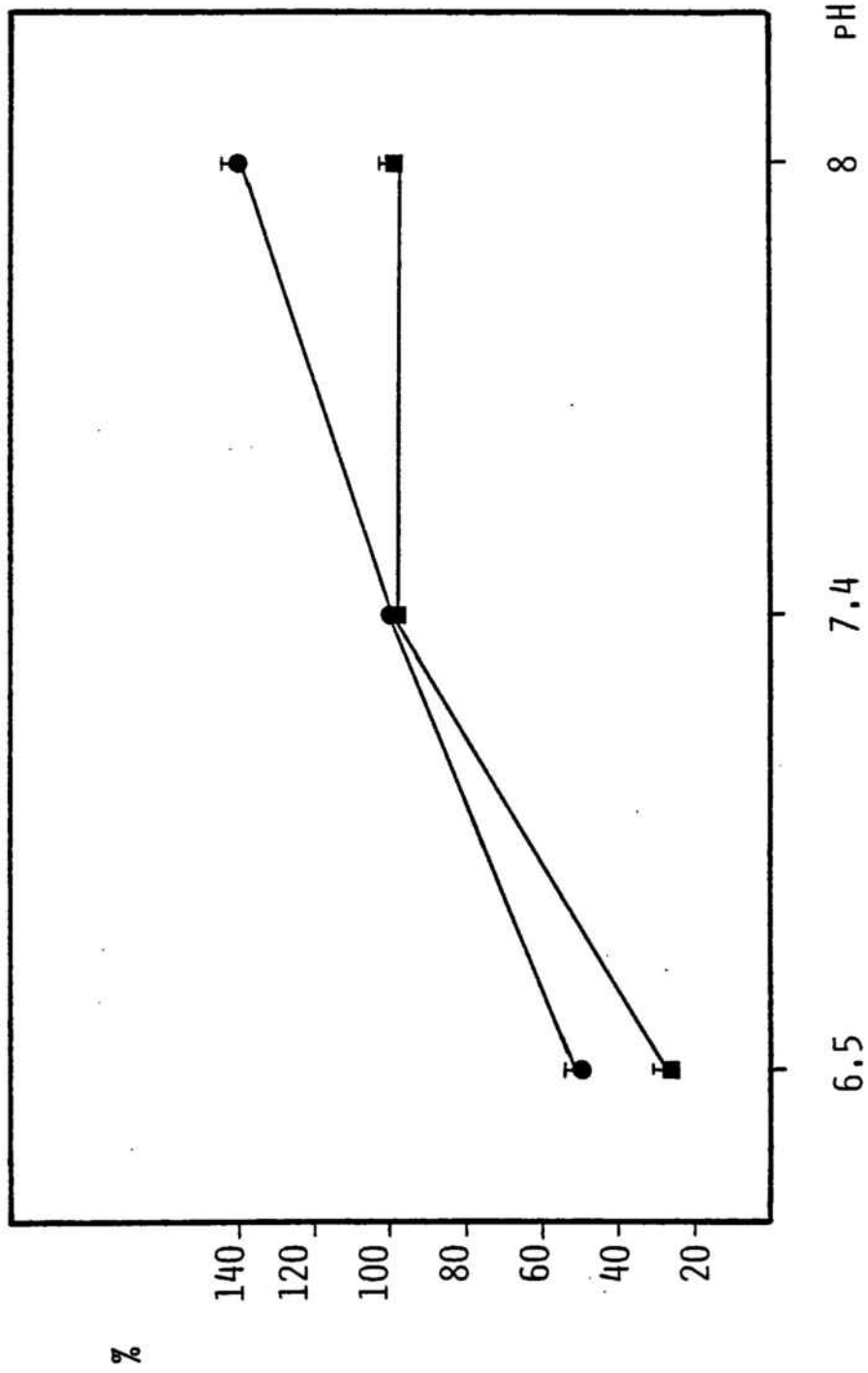
Incubació: 1 min. a 37 C. Reticulòcits: 40%

Valors: % del transport basal (sense inhibidors).

<u>INHIBIDOR</u>	<u>Na⁺</u>	<u>K⁺</u>	<u>Na⁺-K⁺</u>
L-Ala	19.0±1.5 ***	61.4±1.4 ***	12.3
L-His	57.2±2.8 ***	72.9±4.3 **	54.8
L-Leu	35.8±5.3 ***	53.6±3.4 ***	33.0
MeAIB	108.6±9.1 ns	92.9±4.3 ns	111.1

Estadística: ** p<0.01, *** p<0.001 respecte al transport basal de glutamina (sense inhibidor).

GRAFICA IV.3.12. EFECTE DEL pH SOBRE EL TRANSPORT D'ALANINA I DE GLUTAMINA EN RETICULOCITS.
(37°C, 0.1 mM, 1 MIN.). ● ALANINA; ■ GLUTAMINA (RETICULOCITS:42%)



l'alanina. A pH per sobre de 7.4 el transport de L-alanina s'estimula en un 140% respecte al valor a pH de 7.4, mentre que el transport de glutamina no sembla afectat pel pH més alt.

IV.3.5. Transport de L-leucina.

En la gràfica IV.3.13 es mostra la captació de L-leucina en funció del temps en una suspensió cel.lular amb un 42% de reticulòcits, mesurada a 20 C i a una concentració inicial de L-leucina de 0.2 mM, en presència i absència de sodi. Com es pot observar, no hi ha diferències quant a la presència de sodi en el medi. La captació en funció del temps mostra un perfil molt irregular anant d'una relació IN/OUT de 0.65 en el minut 1 d'incubació a una relació de 0.3 als 120 minuts d'incubació.

En la gràfica IV.3.14 es mostra el transport de L-leucina en un marge de concentracions entre 0.1 i 40 mM, en una suspensió cel.lular amb un 41% de reticulòcits, mesurat a 20 C i 0.5 minuts d'incubació. El transport de leucina segueix una cinètica saturable amb una $V_{m\grave{a}x.}$ de 6.4 umols/mlAIC/min. i una K_m de 3.16 mM

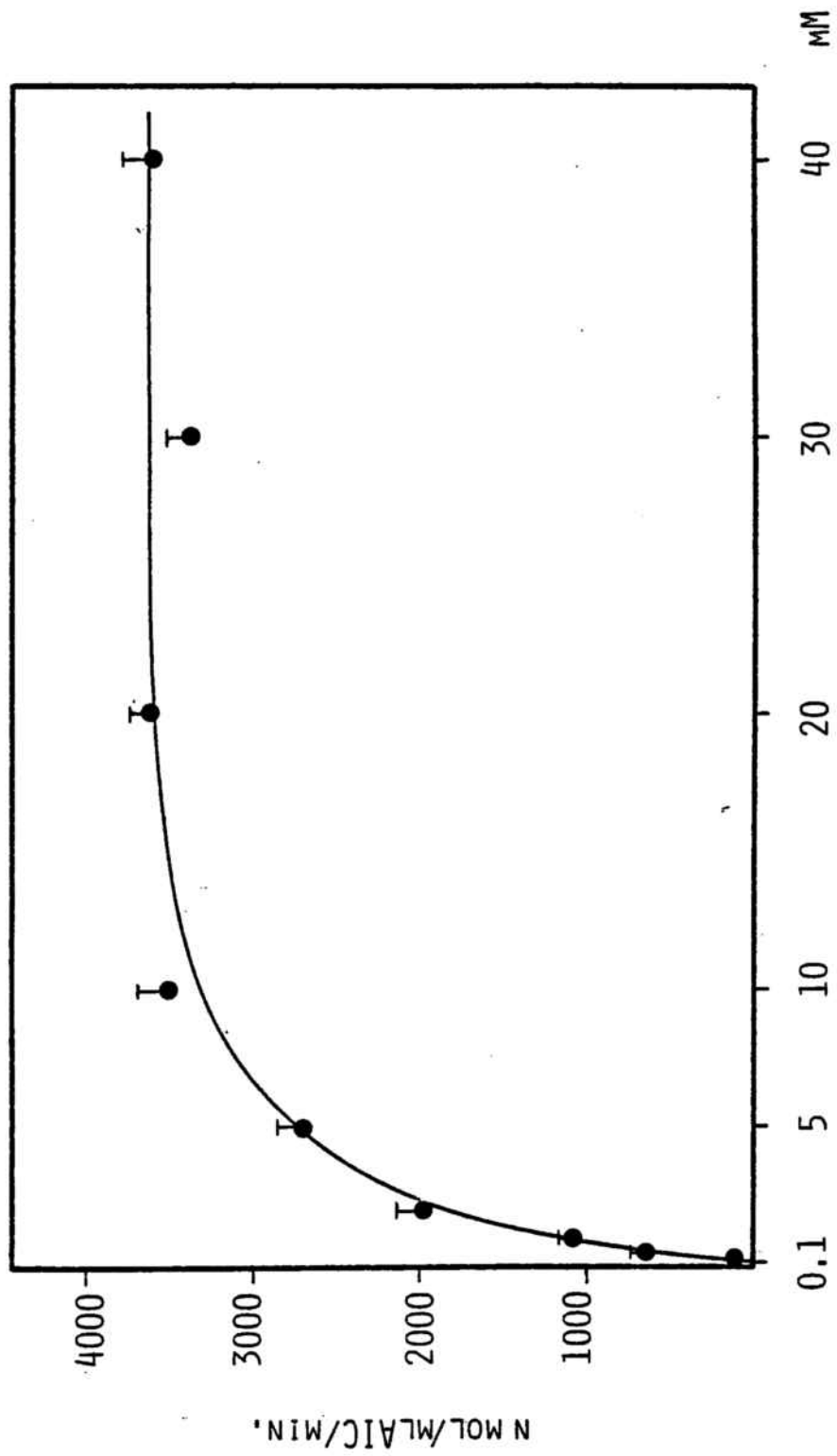
La linialització del transport de L-leucina es mostra en la gràfica IV.3.15. Com es pot observar, només hi ha evidència d'un component amb un coeficient de correlació de 0.988.

IV.3.6. Transport de L-glutamat.

En la gràfica IV.3.16 es mostra la captació de L-glutamat en funció del temps, d'una suspensió cel.lular amb un 41% de reticulòcits, mesurada a 37 C i amb una concentració inicial de L-glutamat de 0.2 mM, en presència i

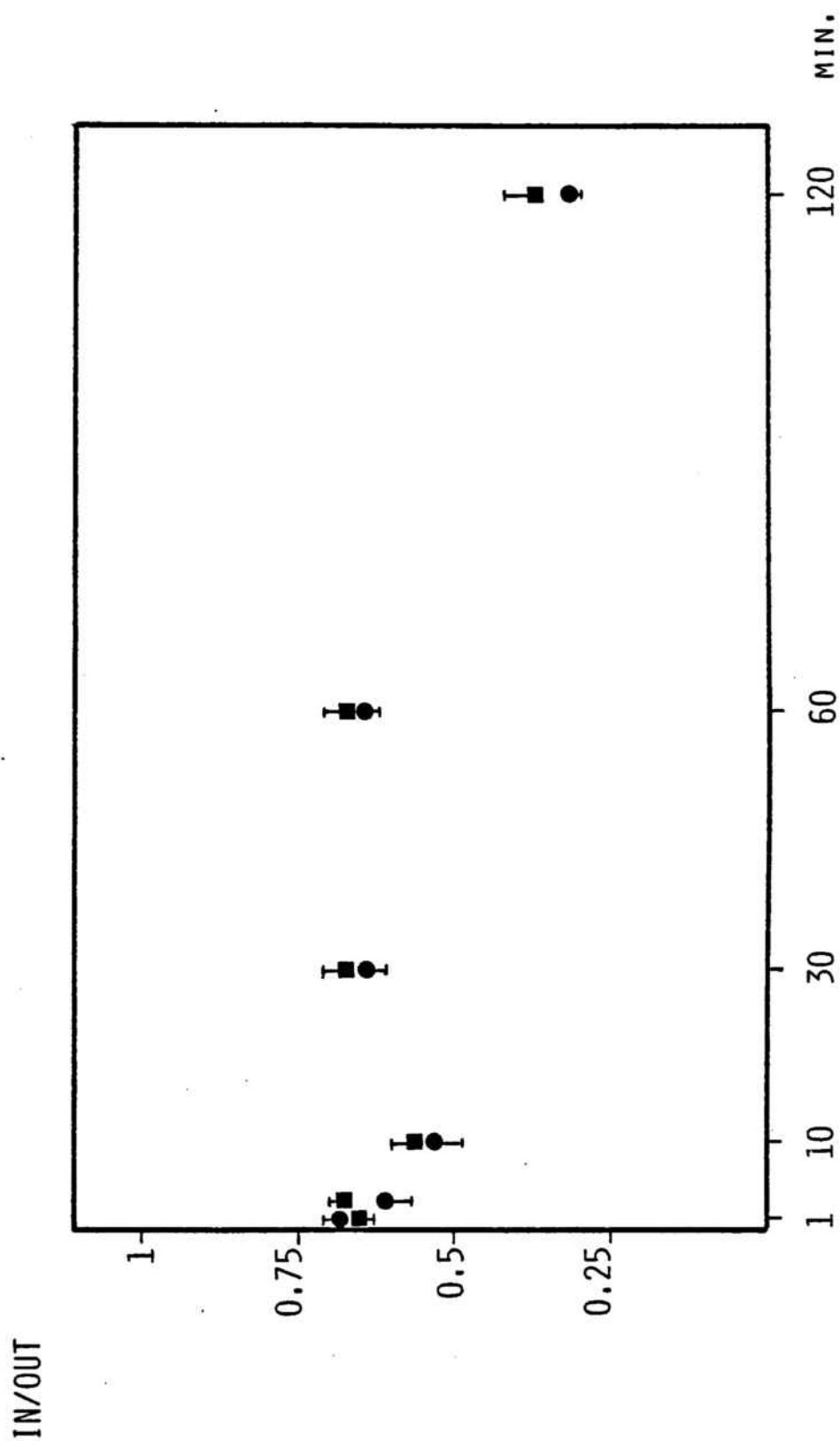
absència de sodi. Com es pot observar, la captació és molt baixa, sense indicis d'equilibració duranr els 120 minuts de la incubació, assolint en aquest temps una relació IN/OUT propera a 0.2.

GRAFICA IV.3.14. CINETICA DEL TRANSPORT DE 14-C LEUCINA EN RETICULOCITS. (20°C, 0.5 MIN).
(RETICULOCITS:41%)

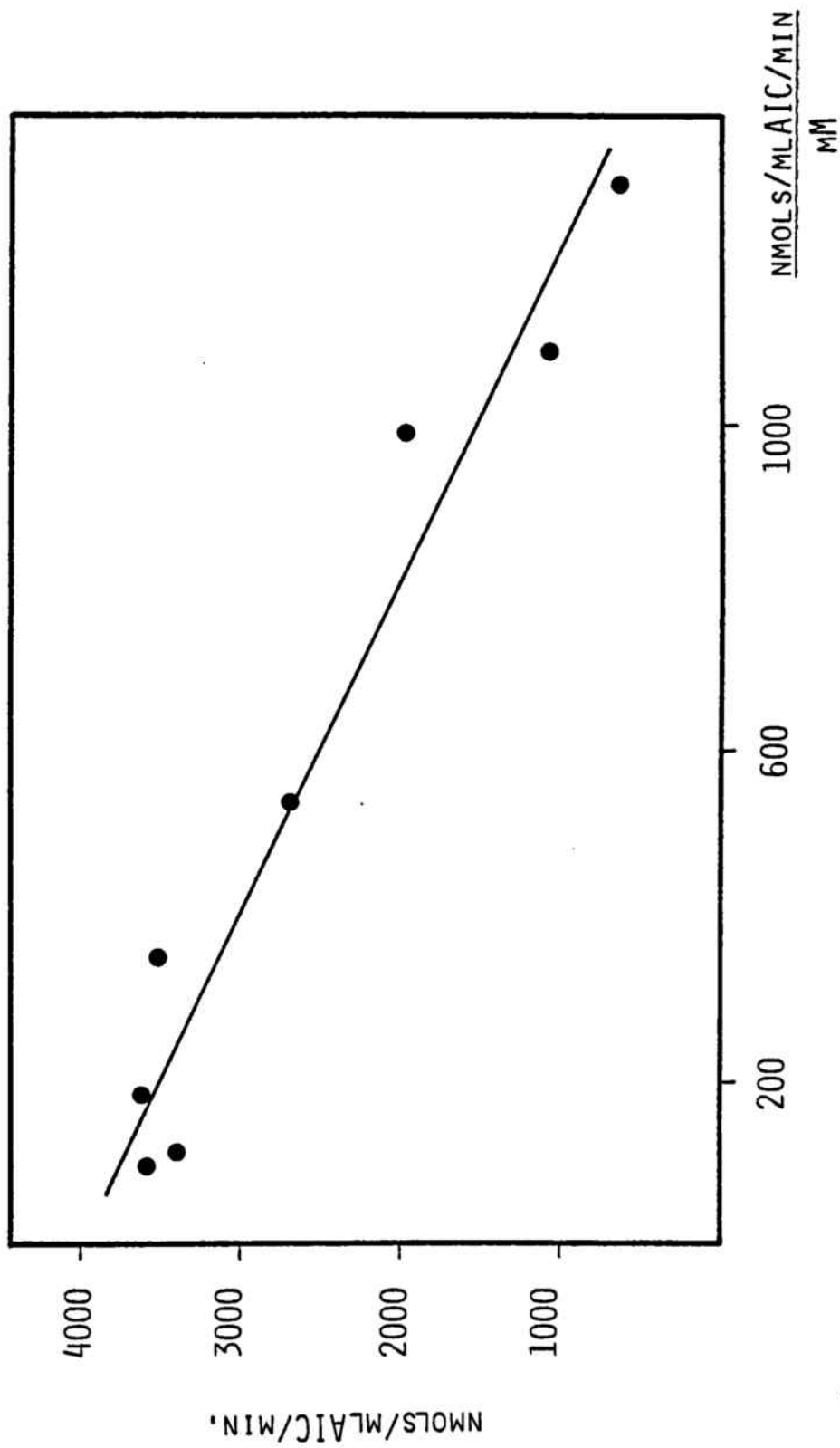


GRAFICA IV.3.13. CAPTACIO DE 14-C LEUCINA PER RETICULOCITS. (20°C, 0.2 mM).
(RETICULOCITS:42%)

● Na⁺
■ K⁺

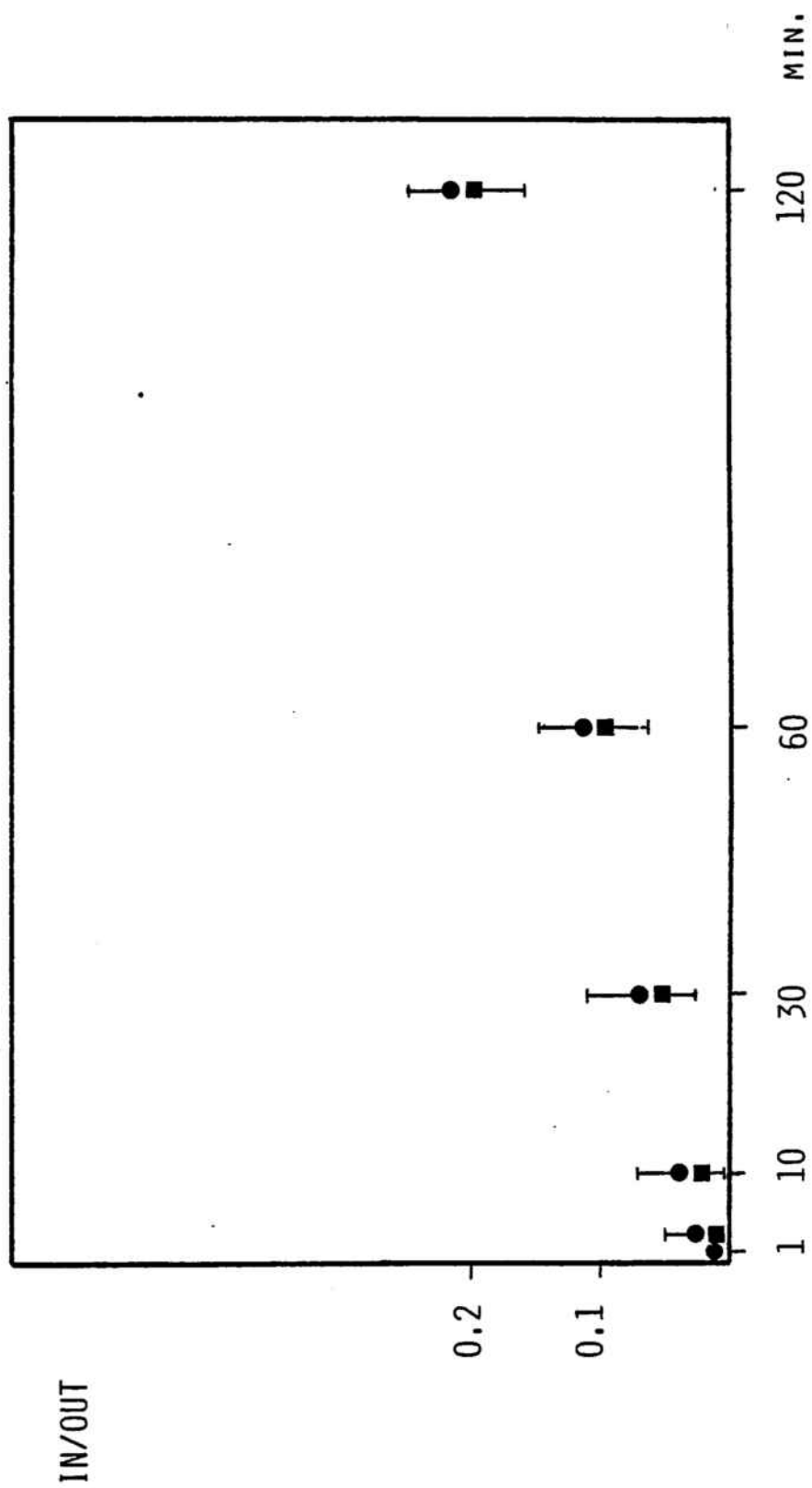


GRAFICA IV.3.15. LINIALITZACIO DEL TRANSPORT DE 14-C LEUCINA EN RETICULOCITS. (20°C, 0.5 MIN.)



GRAFICA IV.3.16. CAPTACIO DE 14-C GLUTAMAT PER RETICULOCITS. (37°C, 0.2 MM).

● Na^+
■ K^+
(RETICULOCITS:41%)



IV.4. PART 4: CONTRIBUTIÓ DELS RETICULÒCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS.

IV.4.1. Paràmetres hemàtics i fluxos sanguinis.

En la taula IV.4.1 es mostren una sèrie de paràmetres hemàtics de la sang amb alts nivells de reticulòcits. Comparant-los amb els representats en la gràfica IV.1.1 corresponents a sang normal s'observa que la densitat de les cèl.lules no varia però si el contingut d'aigua, el qual és més alt quan hi ha alts nivells de reticulòcits. Per altra banda, el nombre de cèl.lules per unitat de volum és més baix com correspon a un hematòcrit també més baix, mentre que, evidentment, el nombre de reticulòcits és molt més alt. Com a conseqüència del menor nombre de cel.lules, la concentració d'hemoglobina és més baixa, però el contingut per cèl.lula és el mateix (HCM), mentre que les cèl.lules semblen ser més grosses en el cas dels reticulòcits. Per altra banda, l'activitat de l'aspartat transaminasa és més alta en reticulòcits, mentre que l'activitat alanina transaminasa no varia.

En la taula IV.4.2 es mostren el pH, pO_2 i pCO_2 de les venes estudiades de rates amb alts nivells de reticulòcits circulants (40%). El pH no varia en cap de les venes respecte al valor de l'artèria. La pO_2 és més baixa en les venes (sobretot en l'hepàtica) que en l'artèria, mentre que la pCO_2 és més alt en les venes que en l'artèria. En cap d'aquests casos s'observen diferències respecte als valors corresponents als mateixos vasos sanguinis de rates normals mostrats en la taula IV.1.2.

Els fluxos sanguinis en ml/min. dels vasos sanguinis estudiats en rates amb alts nivells circulants de reticulòcits en mostren en la taula IV.3.3. No observem cap

TAULA IV.4.1. PARÀMETRES HEMÀTICS I ACTIVITAT GOT I GPT EN "RETICULÒCITS".

Densitat cèl.	1.07±0.02
% Aigua cèl.	65.07±0.17
Cèl.x10 ⁶ /mm ³	5.06±0.06
Hct %	33.88±0.13
% Reticulocits	34.25±6.18
Hb g/100 ml sang	9.06±0.35
CHCM u ³	26.75±1.03
VCM u ³	66.97±0.25
HCM pg/cèl.	17.91±0.69
GOT UI/L cèl.	3449±276
GPT UI/L cèl.	1038±44

essent Hb: hemoglobina
 CHCM: contingut d'hemoglobina corpuscular mitja
 VCM: volum corpuscular mitjà
 HCM: hemoglobina corpuscular mitjana

TAULA IV.4.2. pH, pO_2 I pCO_2 EN L'ARTÈRIA I LES VENES ESTUDIADES DE RATES AMB ALTS NIVELLS DE RETICULÒCITS CIRCULANTS.

Reticulocits: 40%

	<u>pH</u>	<u>pO_2</u>	<u>pCO_2</u>
A. Aorta	7.39±0.02	105.8±4.6	35.2±2.6
V. Porta	7.33±0.03	64.5±3.9	46.8±1.3
V. Hepàtica	7.33±0.02	48.5±1.5	44.0±2.0

TAULA IV.4.3. FLUXOS SANGUINIS DE LES VENES DE RATES AMB ALTS NIVELLS DE RETICULÒCITS CIRCULANTS.

Reticulòcits:40%

	<u>ml/min</u>
V. Hepàtica	21.87±0.29
V. Porta	14.23±0.20
A. Hepàtica	7.64±0.11

diferència respecte els fluxos d'aquests mateixos vasos de rates normals (vegeu taula IV.1.3).

IV.4.2. Concentració d'aminoàcids en l'artèria: sang i compartimentació sanguinària.

En la taula IV.4.4 es mostra la concentració d'aminoàcids en sang arterial total i en les dues fraccions sanguínies de rates amb alts nivells de reticulòcits circulants. S'observa que la taurina, aspartat, glutamat, glicina i arginina estan més concentrats en la fracció corpuscular que en la plasmàtica, mentre que treonina, glutamina, prolina, alanina, citrul.lina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina, ornitina i estan més concentrats en la fracció plasmàtica de la sang que en la corpuscular. Per serina, asparagina i lisina no existeixen diferències.

En la taula IV.4.5 es mostra la concentració d'aminoàcids en les cèl.lules i en el plasma arterials de rates amb alts nivells de reticulòcits circulants(40%) i la relació de concentracions cèl.lules/plasma. Els aminoàcids que estan més concentrats en les cèl.lules respecte a la concentració en plasma són per ordre: aspartat, glutamat, taurina, arginina, asparagina, glicina, serina, lisina, alanina, glutamina, treonina i tirosina. La prolina, citrul.lina, valina, leucina, fenilalanina, histidina i ornitina no presenten una relació E/P diferent de 1. Els aminoàcids que presenten una concentració en cèl.lules més baixa respecte a la plasmàtica són, per ordre de relació E/P més petita: metionina i isoleucina. Comparant les relacions E/P d'aquestes rates amb els valors de rates normals (taula IV.1.5) s'observa que en les rates amb alts nivells de reticulòcits hi ha un augment de la relació per aspartat, serina, asparagina, glicina i arginina, mentre que la

TAULA IV.4.4. CONCENTRACIÓ D'AMINOÀCIDS EN SANG ARTERIAL I EN LES DUES FRACCIONS SANGUINIES DE RATES AMB ALTS NIVELLS DE RETICULÒCITS CIRCULANTS.

Valors en umols/l de sang. (promig de 10 animals).

<u>AMINOACID</u>	<u>SANG</u>	<u>FC</u>	<u>FP</u>	
TAU	418.4±24.1	316.2±28.6	118.8±6.4	***
ASP	84.5±1.4	70.9±3.5	16.2±0.9	***
THR	367.4±44.9	143.3±23.3	224.1±24.3	*
SER	268.5±8.9	126.9±10.1	141.0±8.9	ns
ASN	46.1±2.0	27.6±3.1	20.8±2.0	ns
GLU	202.0±21.7	147.6±18.6	52.8±4.5	***
GLN	591.4±75.6	226.9±34.3	338.1±28.8	*
PRO	151.9±18.6	29.4±6.1	129.9±14.5	***
GLY	369.5±11.4	188.7±11.9	153.2±8.9	*
ALA	470.6±39.6	186.4±31.4	268.1±13.3	*
CIT	81.3±2.1	21.5±3.2	58.8±4.0	***
VAL	116.8±6.4	26.6±0.7	94.5±5.65	***
MET	31.0±1.4	2.5±1.1	30.6±1.1	***
ILE	61.8±2.3	12.9±1.3	51.7±2.6	***
LEU	94.3±4.2	22.1±2.6	71.7±5.6	***
TYR	40.3±2.9	12.8±1.7	27.5±1.9	***
PHE	42.8±4.0	9.9±1.8	35.1±1.7	***
HIS	58.3±3.0	13.7±1.1	41.7±2.0	***
TRP	23.6±2.2	-	51.2±1.7	-
ORN	51.2±4.1	14.7±3.6	37.5±2.6	***
LYS	357.2±23.9	167.8±16.6	206.3±13.8	ns
ARG	201.7±2.7	123.9±9.2	86.8±4.4	**

FC: Fracció corpuscular de la sang

FP: Fracció plasmàtica de la sang

Estadística: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 respecte la fracció corpuscular de la sang.

TAULA IV.4.5. CONCENTRACIÓ D'AMINOÀCIDS EN LES CÈL.LULES SANGUINIES I EN EL PLASMA DE RATES AMB ALTS NIVELLS CIRCULANTS DE RETICULÒCITS.

Valors corregits pel contingut d'aigua i expressats en uM. (promig de 10 animals). Reticulòcits: 40%

<u>AMINOACID</u>	<u>CEL.LULES</u>	<u>PLASMA</u>	<u>E/P</u>	
TAU	1556.0±140.8	184.6±10.0	8.43±0.99	***
ASP	348.8±17.4	25.1±1.5	13.89±0.82	***
THR	705.1±114.4	348.2±37.8	2.03±0.33	*
SER	624.5±49.7	219.1±13.8	2.85±0.23	***
ASN	135.8±15.8	32.3±3.2	4.20±0.49	***
GLU	726.4±91.5	82.1±6.9	8.84±1.11	***
GLN	1116.7±168.8	525.3±44.7	2.13±0.32	**
PRO	144.7±30.0	201.8±22.5	0.72±0.15	ns
GLY	928.7±59.6	238.0±13.8	3.90±0.25	***
ALA	917.4±154.5	416.5±20.7	2.20±0.37	**
CIT	105.8±15.8	91.4±6.2	1.17±0.17	ns
VAL	130.9±3.4	146.8±8.8	0.89±0.05	ns
MET	12.3±5.3	47.5±1.7	0.26±0.11	***
ILE	63.8±6.5	80.3±4.0	0.79±0.08	*
LEU	108.8±12.8	111.4±8.7	0.98±0.12	ns
TYR	63.2±8.4	42.7±2.9	1.48±0.20	*
PHE	48.7±8.9	54.5±2.6	0.89±0.16	ns
HIS	67.4±5.4	64.8±3.1	1.04±0.08	ns
TRP	-	79.5±2.6	-	
ORN	96.8±17.6	58.1±4.0	1.66±0.30	ns
LYS	825.8±81.7	320.5±21.4	2.58±0.25	***
ARG	609.8±45.3	134.9±6.84	4.52±0.34	***

Estadística: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 respecte a 1.

relació és més baixa per prolina, citrul.lina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina i histidina.

IV.4.3. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena porta.

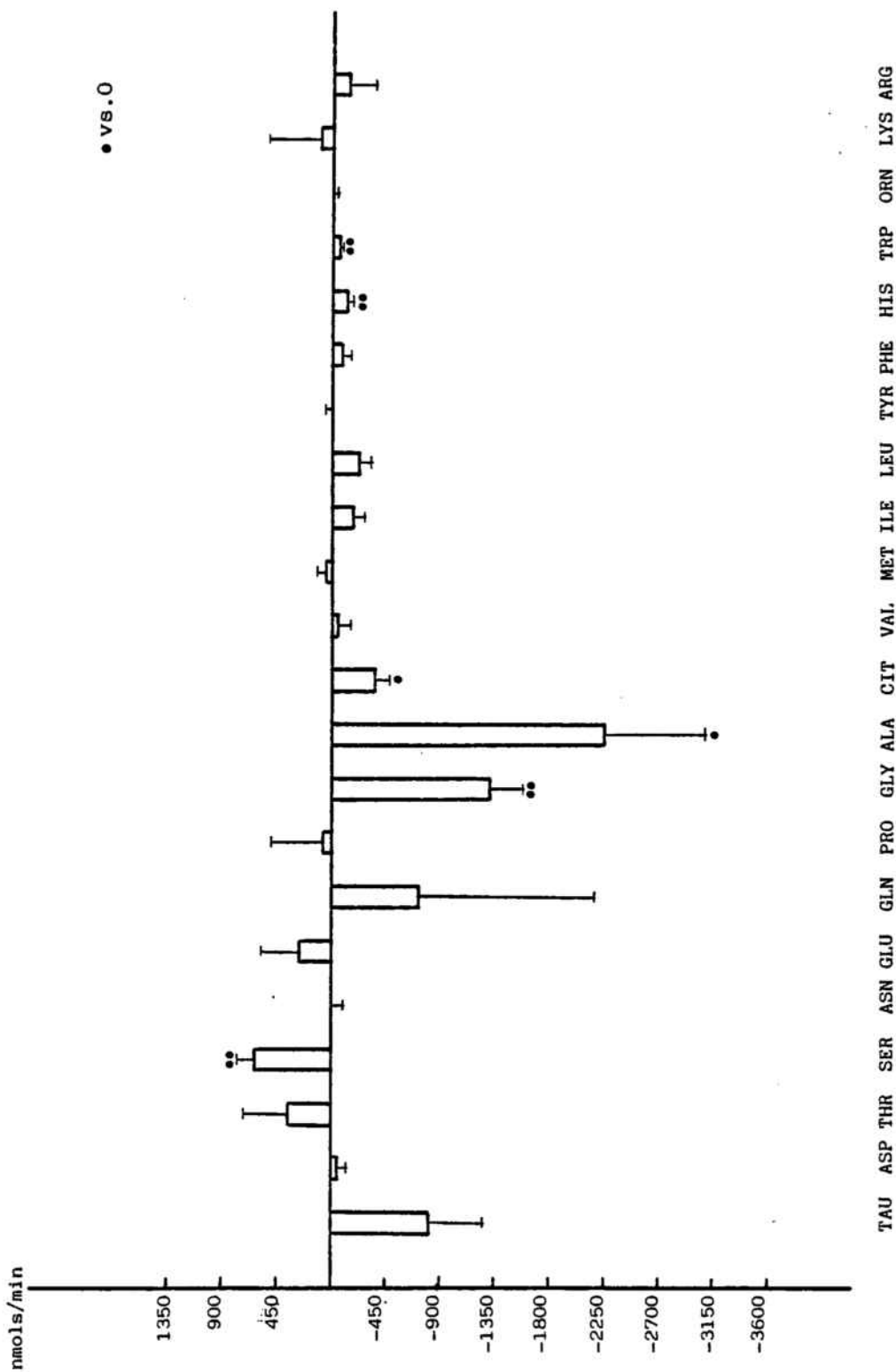
En la gràfica IV.4.1 es mostra el balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena porta mesurat en sang total en animals amb alts nivells de reticulòcits circulants (40%). Com es pot observar, aquests teixits alliberen principalment alanina i glicina, essent també l'alliberament significatiu per citrul.lina, histidina i triptofan. La serina és l'únic aminoàcid que és captat de forma significativa per aquests teixits. Tots els altres aminoàcids presenten un balanç nul.

En la gràfica IV.4.2 es mostra la contribució de les dues fraccions sanguínies al balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena porta. Aquests teixits alliberen a la fracció corpuscular de la sang glicina, citrul.lina, isoleucina, leucina i histidina, mentre que capten aminoàcids de la fracció corpuscular, essent significativa per metionina, isoleucina, leucina, triptofan i lisina. Existeix un comportament contraposat de les dues fraccions sanguínies per la leucina i la isoleucina. Per citrul.lina, triptofan i arginina, malgrat que els comportaments no siguin contraposats sí que són significativament diferents.

IV.4.4. Balanç hepàtic d'aminoàcids.

En la gràfica IV.4.3 es mostra el balanç hepàtic d'aminoàcids en sang total de rates amb un 40% de reticulòcits circulants. S'ha de destacar la gran captació hepàtica d'alanina i glutamina. Apart d'aquests dos

GRAFICA IV.4.1.1. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA PORTA.
 SANG TOTAL. (RETICULOCITS). (+) captació. (-) alliberament.

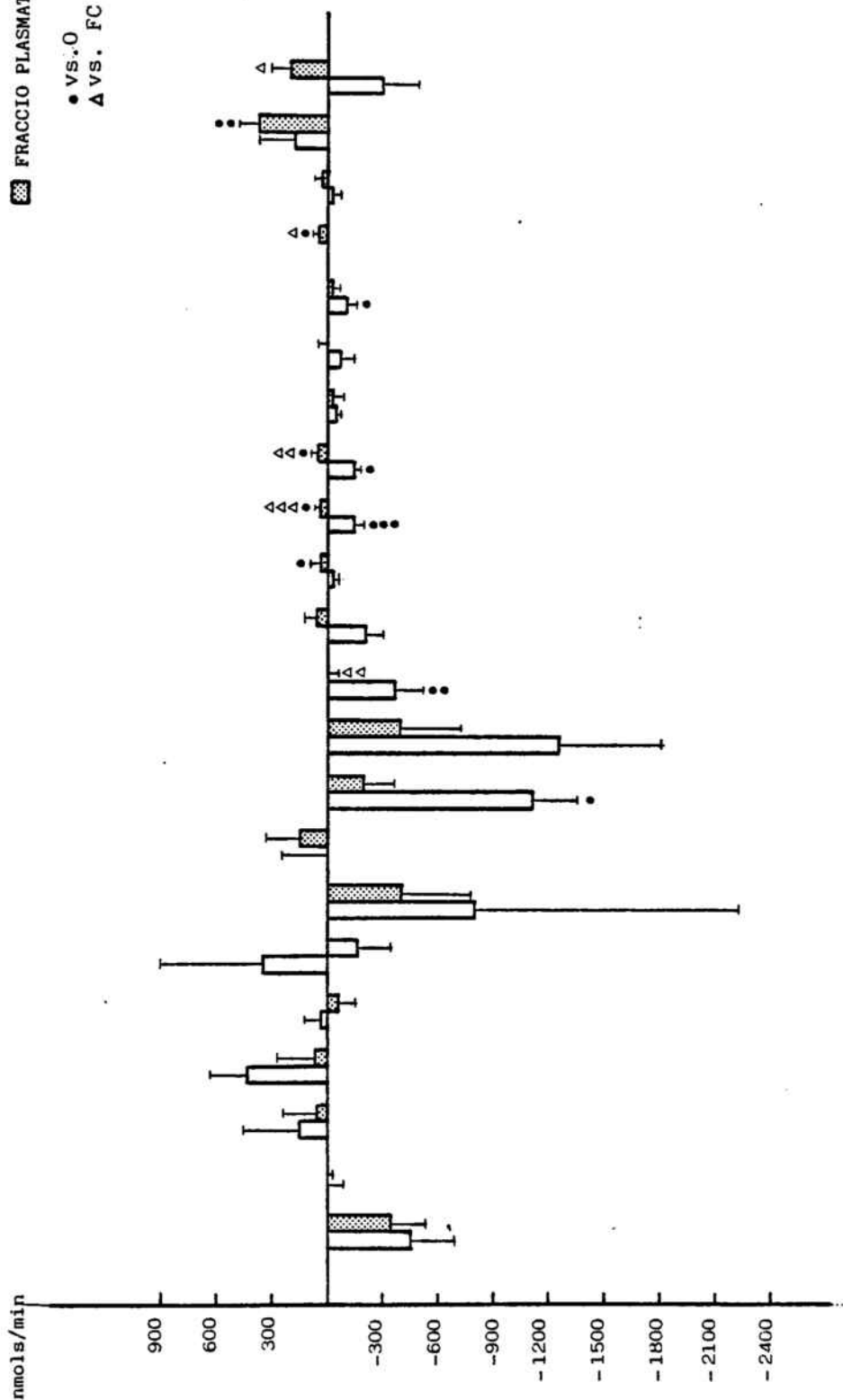


GRAFICA IV.4.2. BALANÇ D'AMINOACIDS DELS TEIXITS DRENATS PER LA VENA PORTA.

FRACCIONS SANGUINIES. (RETICULOCITS). (+) captació. (-) alliberament.

□ FRACCIO CEL·LULAR
 ▨ FRACCIO PLASMÀTICA

● vs. 0
 ▲ vs. FC



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

aminoàcids també són captats de forma significativa el glutamat, citrul.lina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina. La resta d'aminoàcids presenta un balanç nul.

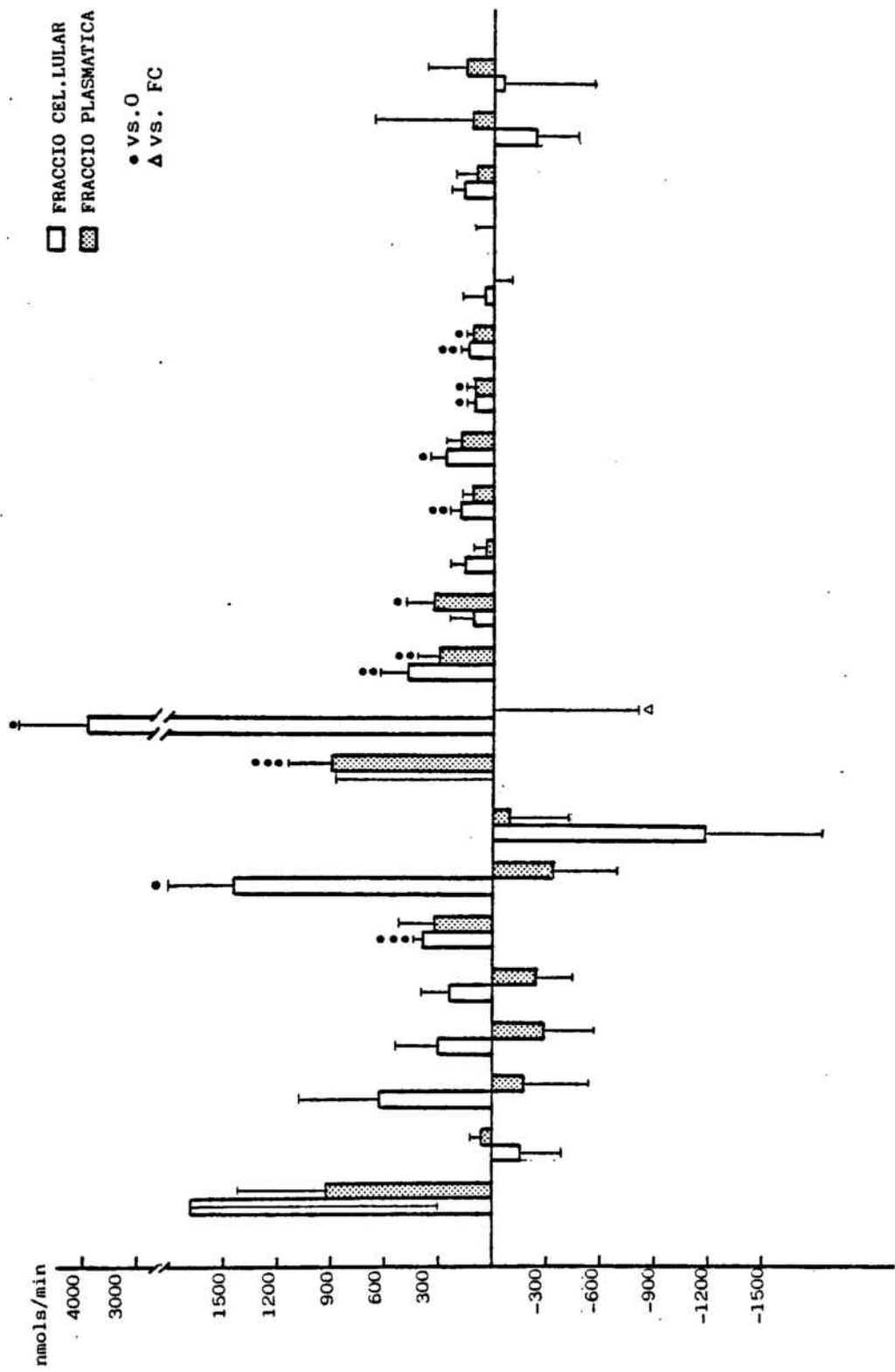
En la gràfica IV.4.4. es mostra la contribució de les dues fraccions sanguínies al balanç hepàtic d'aminoàcids. El fetge de la fracció corpuscular glutamat, glutamina, alanina, citrul.lina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina i de la fracció plasmàtica glicina, citrul.lina, valina, tirosina i fenilalanina. No hi ha cap cas en que els dos compartiments sanguinis es comportin de forma contraposada, però pel cas de l'alanina es comporten diferent de forma estadísticament significativa.

IV.4.5. Balanç esplàncnic d'aminoàcids.

En la gràfica IV.4.5 es mostra el balanç esplàncnic d'aminoàcids mesurat en sang total de rates amb un 40% de reticulòcits circulants. Com es pot observar, el llit esplàncnic capta de forma significativa serina, glutamat, glutamina, alanina, valina i tirosina. Tots els altres aminoàcids presenten un balanç nul.

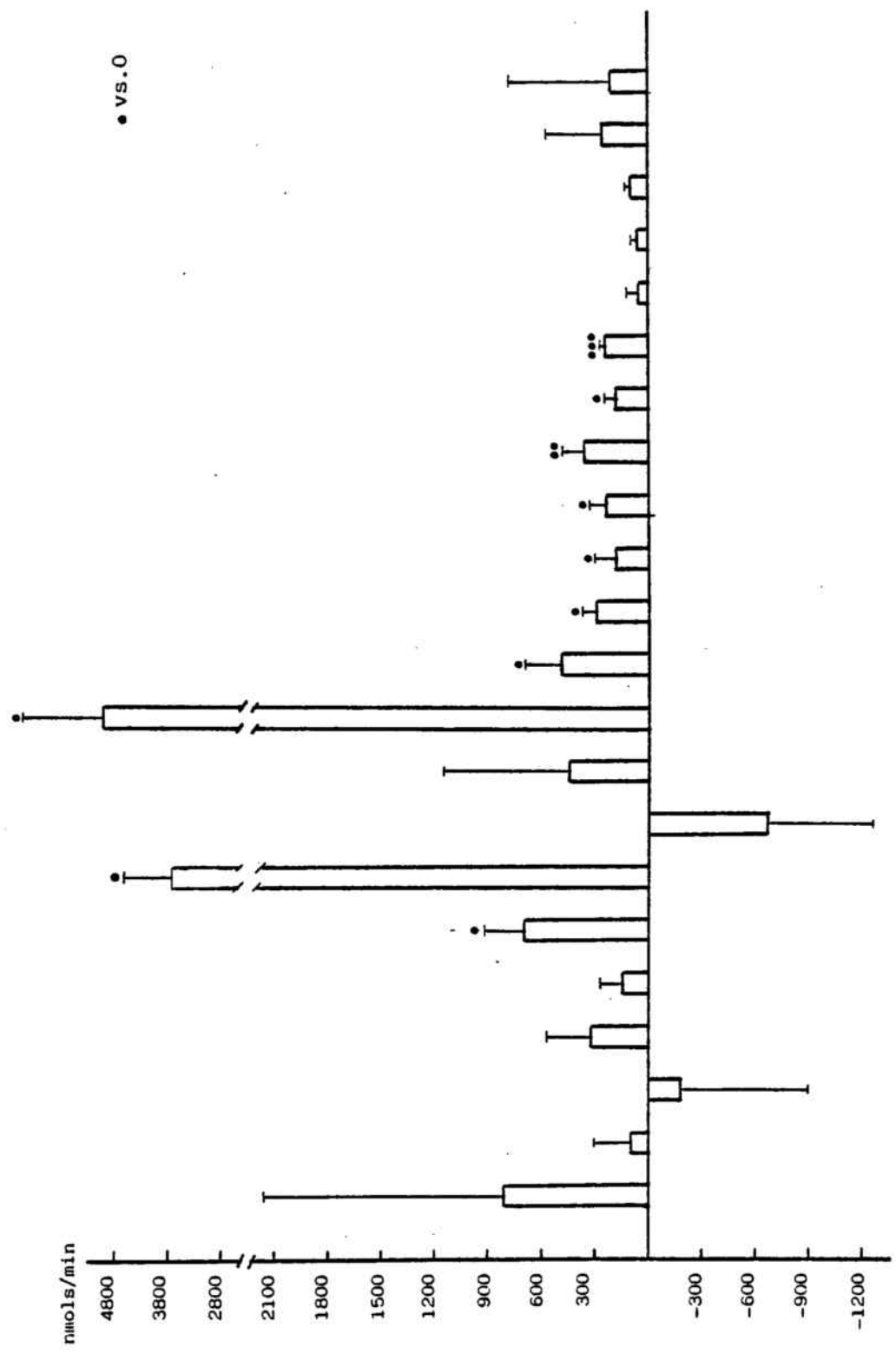
En la gràfica IV.4.6 es mostra la contribució de les dues fraccions sanguínies al balanç esplàncnic d'aminoàcids. El llit esplàncnic capta de la fracció corpuscular treonina i alanina, mentre que ho fa de la fracció plasmàtica de la sang per aspartat, prolina, glicina, citrul.lina, isoleucina, leucina, tirosina i fenilalanina. La prolina és l'únic cas en que s'observa un comportament significativament contraposat dels dos compartiments sanguinis, mentre que per serina, glutamina, valina i leucina són estadísticament diferents.

GRAFICA IV.4.4. BALANÇ HEPATIC D'AMINOACIDS. FRACCIONS SANGUINIES.
 (RETICULOCITS). (+) Captació. (-) Alliberament.



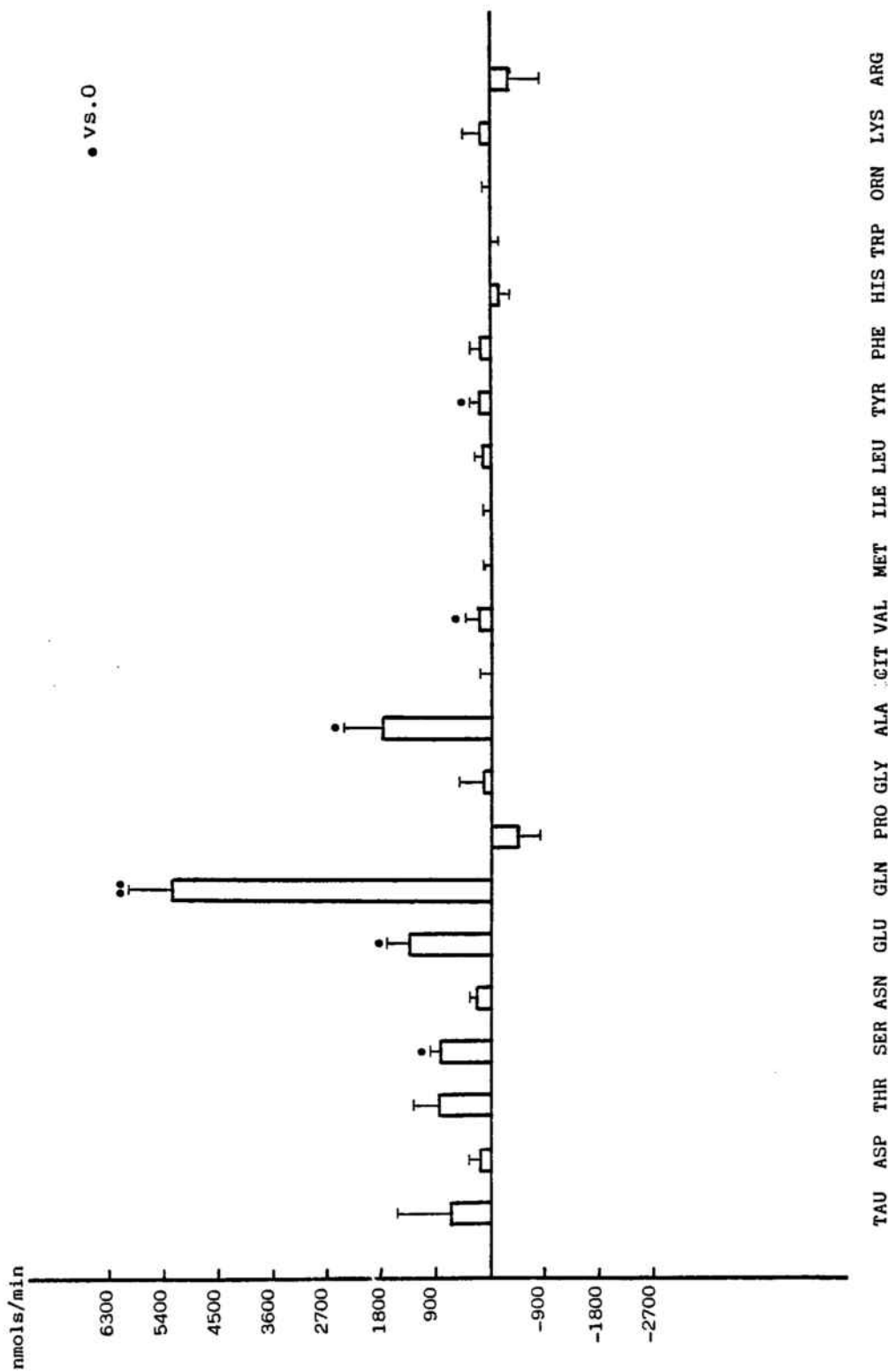
TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.4.3. BALANÇ HEPATIC D'AMINOACIDS. SANG TOTAL. (RETICULOCITS).
 (+) Captació, (-) Alliberament.

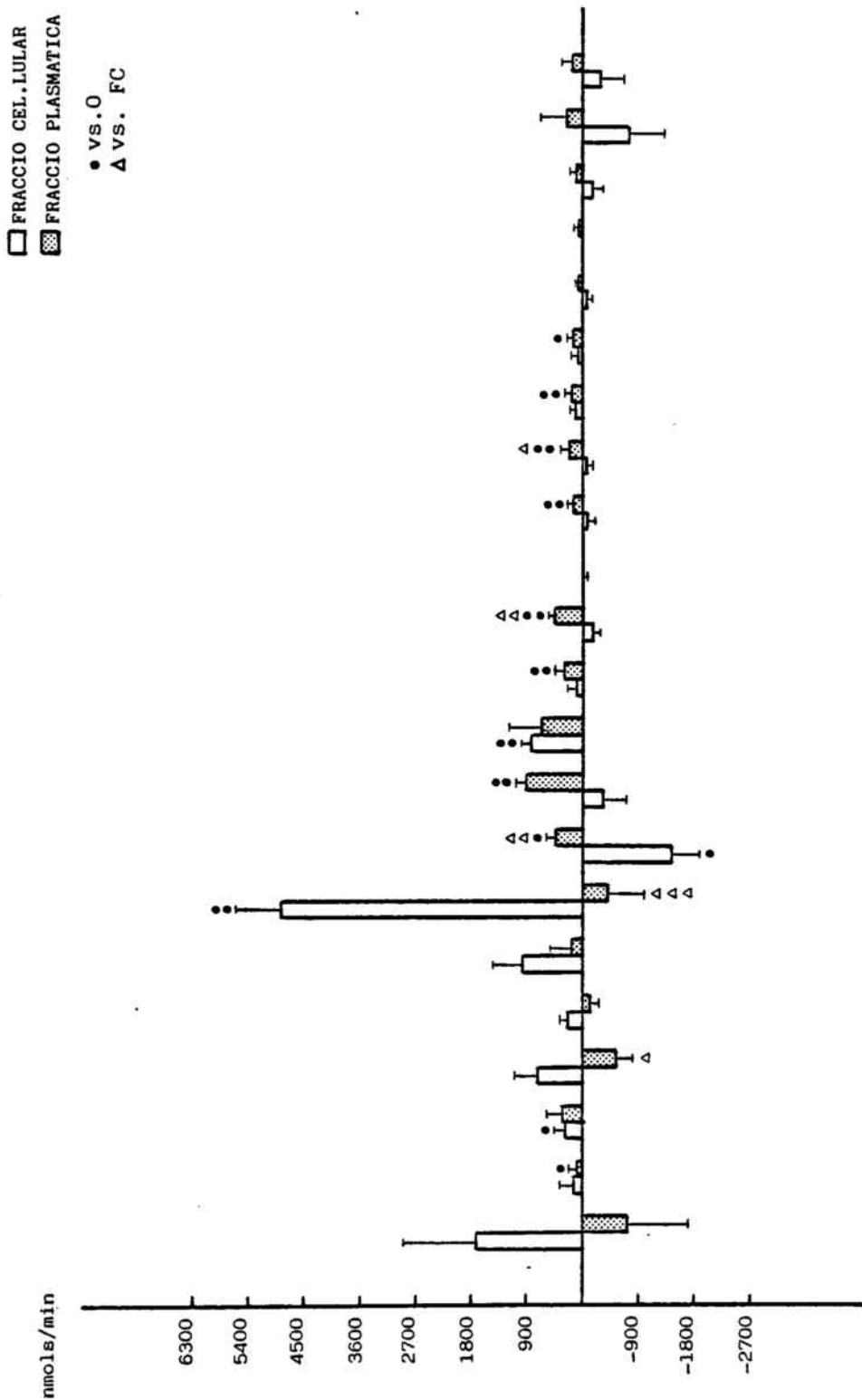


TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

GRAFICA IV.4.5. BALANÇ ESPLANÇNIC D'AMINOACIDS. SANG TOTAL. (RETICULOCITS).
 (+) captació. (-) alliberament.



GRAFICA IV.4.6. BALANÇ ESPLANÇNIC D'AMINOACIDS. FRACCIONS SANGUINIES.
(RETICULOCITS). (+)captació. (-)alliberament.



TAU ASP THR SER ASN GLU GLN PRO GLY ALA CIT VAL MET ILE LEU TYR PHE HIS TRP ORN LYS ARG

V. DISCUSSIÓ

V.1. PART 1: CONTRIBUTIÓ DELS ERITROCITS AL TRANSPORT "IN VIVO" D'AMINOÀCIDS ENTRE ÒRGANS.

V.1.1. Paràmetres hemàtics i estat dels animals.

Tots els paràmetres hemàtics estudiats (taula IV.1.1) ens permeten considerar que la sang de la qual hem fet les mesures dels balanços d'aminoàcids és normal, sense indicis de cap alteració important.

El pH sanguini té uns valors que estan dins la normalitat (Squires i col., 1976 entre d'altres), i en cap de les venes estudiades trobem diferències. Aquests resultats ens indiquen que els nostres animals no són acidòtics (taula IV.1.2), com també són normals els valors de pO_2 i de pCO_2 que hem obtingut (taula IV.1.2), essent la pO_2 més alta l'arterial i més baixes en les venes com a conseqüència del metabolisme dels teixits, la qual cosa es correspon amb els valors més alts de pCO_2 en les venes que en l'artèria.

Tots aquest paràmetres ens serveixen per a determinar com a normal l'estat dels animals que hem emprat en aquest estudi, comprovació que és important a l'hora de descriure fluxos d'aminoàcids, en haver-se descrit canvis importants d'aquests fluxos en situacions en les que per exemple el pH és baix (Squires i col., 1976; Schrock i Goldstein, 1981; Brosnan i col., 1983).

V.1.2. Discussió del mètode.

L'ús de les diferències arteriovenoses per a estudiar els balanços tissulars de diferents compostos és un fet generalitzat (vegeu apartat I.1 i I.2). Les simples diferències arteriovenoses són únicament, però, una mesura

qualitativa. Per a quantificar les captacions i alliberaments de diferents compostos pels teixits és necessari conèixer el flux sanguini.

Malgrat l'existència de diversos mètodes per a mesurar els fluxos sanguinis, a la bibliografia són comptats els treballs on hagin estat mesurats, i d'ací que, en general, manquin dades quantitatives dels balanços d'aminoàcids, sobretot, i molt especialment, en animals petits com la rata. Una de les causes d'aquest fet és la dificultat tècnica de la mesura del flux sanguini. Dels mètodes actualment existents, podriem dir que els més emprats són per una banda les tècniques clàssiques que es basen en l'administració d'un indicador no metabolitzable, com per exemple l'àcid aminohipúric, i el càlcul del flux es realitza per mesures d'aquest indicador en el vas sanguini corresponent (per exemple i com a més recents, Rémésy i Demigné, 1983; Rémésy i col., 1983). Aquests mètodes tenen el desavantatge d'ésser molt invasius, i de permetre només la mesura del flux en una vena, o dues com a màxim per animal, i només aquelles venes de les que es pugui obtenir una mostra de sang, i per tant en animals petits queda restringit a uns pocs òrgans. Dels mètodes més recents, el més implantat és l'ús de les microesferes radioactives, les quals s'administren a la circulació general. Per la seva grandària, les microesferes queden atrapades en els teixits, i el comptatge de radioactivitat d'aquests teixits permet conèixer el flux sanguini d'aquell teixit (per exemple, Buelke-Sam i col., 1982; Ahokas i col., 1984). Aquest mètode té l'avantatge de permetre el càlcul del flux sanguini de tots els teixits que es vulgui per animal. El fet, però, de mesurar el flux sanguini com el flux de sang que arriba a un teixit pot convertir-se en desavantatge. Quan l'aplicació del flux sanguini és per quantificar balanços de compostos a través de diferents teixits, el que cal tenir és el flux

sanguini corresponent al vas sanguini amb el que s'ha calculat les diferències arteriovenoses, i això no és gaire fàcil amb el mètode de les microesferes radioactives, ja que en la majoria dels casos una vena drena més d'un teixit, com per exemple la vena porta, la il·líaca ó la jugular. Per aquests casos s'ha de calcular quins teixits són drenats per una vena determinada i en quina proporció.

Apart d'aquestes consideracions, ambdós tipus de mètodes mostren elevats errors experimentals (vegeu per exemple Rémésy i col., 1983; Buelke-Sam i col., 1982) superiors en molts casos al 16 ó 17%.

Hi ha una altre mètode que normalment no s'ha aplicat en aquests tipus d'estudis. Es tracta del mètode electromagnètic, el qual mesura el flux sanguini dels vasos sanguinis directament i per tant podem conèixer el flux sanguini de les venes que hem emprat per fer les diferències arteriovenoses. Un altre avantatge que té aquest mètode és que és fàcil, ràpid i relativament poc invasiu (no s'ha d'administrar res). El més notable, però, és la gran repetibilitat que hem obtingut, amb uns errors estàndar inferiors al 10% en les venes de flux més baix i entre el 1-3% en les venes amb més flux, essent els valors mitjanes dels fluxos obtinguts perfectament equiparables als valors descrits (taula IV.1.3). L'únic inconvenient és que per animals petits com la rata, el seu ús queda restringit, ara per ara, als vasos sanguinis més grans. Creiem, doncs, que si es disposa de la infraestructura necessària, aquest és el mètode més fiable i repetitiu de mesura del flux sanguini.

V.1.3. Compartimentació sanguínia d'aminoàcids i concentració en eritròcits i plasma.

La concentració d'aminoàcids en sang arterial (taula

IV.1.4) s'ajusta al descrit anteriorment per la rata per altres autors (Brosnan i col., 1983; Rémésy i col., 1983; Rémésy i Demigné, 1983).

Les dades de compartimentació sanguínia d'aminoàcids i les de concentració en cèl.lules i plasma (taules IV.1.4 i IV.1.5) ens mostren que en l'artèria de rata els eritròcits tenen una concentració més alta que el plasma, amb l'única excepció de la metionina, que es troba en la mateixa concentració. Aquestes dades contrasten completament amb les obtingudes també en rata però en sang barreja d'artèria i vena per Soley i Alemany (1980). Amb l'excepció de la lisina, aquests autors troben que els aminoàcids estan més concentrats en plasma que en les cèl.lules. Els nostres resultats estan més d'acord amb les dades en rata de López-Tejero (1985, 1986) i en humans d'Hagenfeldt i Arvidson (1980), encara que amb diferències individuals importants.

Les dades de concentració intracel.lular i plasmàtica les discutirem posteriorment (apartat V.5) en relació amb les característiques del transport "in vitro".

V.1.4. Balanç intestinal d'aminoàcids.

Els animals emprats en aquest estudi tenien lliure accés al menjar i a la beguda, tant pel que respecte a la quantitat com al temps. En aquestes condicions, dades del nostre laboratori han mostrat que les rates menjen majoritàriament de nit, i que a partir de l'inici del cicle llumínic disminueix molt la ingesta, continuant a nivells molt baixos durant tot el dia (Pastor-Anglada, 1985), d'acord amb Hitier i col. (1982). Donat que els experiments els realitzarem a l'inici de la fase lumínica i tenint en compte que la ingesta no és puntual, sinó que és un procés relativament llarg, ens dificulta el poder definir d'una

forma clara si els animals en el moment de l'obtenció de les mostres es trobaven en estat absortiu, absortiu final o principi del postabsortiu. A més a més, hem de pensar que la definició d'aquests estats, en ser una gradació contínua, és molt poc clara. Si pensem en el significat del que vol dir absortiu, aleshores definirem l'estat dels animals com a absortiu, ja que observem un clar alliberament d'aminoàcids per part de l'intestí (fig.IV.1.1). Brosnan i col. (1983), en un estudi similar al nostre, deixen clar que l'estat dels seus animals és absortiu però només observen una sortida intestinal significativa per alanina i citrul.lina, la qual cosa ens permet fer aquella consideració, pensant, però que si s'hagués extret les mostres unes hores abans potser la sortida d'aminoàcids de l'intestí fóra més important.

En estat absortiu el balanç intestinal d'aminoàcids ha d'ésser negatiu (és a dir, ha d'alliberar aminoàcids a la vena porta) com a conseqüència de l'absorció dels aminoàcids provinents de les proteïnes de la dieta. Però el patró d'aminoàcids alliberats no és exactament el patró dels aminoàcids absorbits. L'intestí altera la composició aminoacídica degut al seu propi metabolisme, essent els aminoàcids essencials els que millor reflecteixen el contingut de la dieta (Elwyn, 1966; Elwyn i col., 1968, 1972; Bourdel i col., 1981 entre d'altres). Amb les nostres dades no podem fer un estudi de correlacions ja que no hem mesurat la composició aminoacídica de les proteïnes de la dieta, però la concordància en l'alliberament d'aminoàcids observat i les dades de la bibliografia abans esmentada, ens permet suposar que la gran sortida d'alanina des del punt de vista quantitatiu no pot ser deguda únicament al seu contingut en la dieta. Aquesta alanina ha de provenir, en part, del metabolisme intestinal.

Es prou coneguda la importància de la glutamina com a

font energètica per l'intestí (Windmueller i Spaeth, 1974, 1980), fet que explica la captació que observem nosaltres (l'únic aminoàcid que és captat de la circulació per l'intestí). Hem de tenir present que la utilització real de glutamina per l'intestí serà més gran que els aproximadament 1000 nmols/min de les nostres dades, ja que els animals es troben en estat absortiu i la glutamina és un aminoàcid relativament abundant en les proteïnes naturals.

La captació de glutamina per l'intestí "in vivo" és una dada que concorda amb les observacions en rates alimentades i dejunades de Windmueller i Spaeth (1974) i Brosnan i col. (1983), en humans postabsortius (Felig i col., 1973) i en be, tant alimentat com dejunat (Heitmann i Bergman, 1980). Es curiós assenyalar que en tots aquests casos els animals han estat mantinguts amb menjar "ad libitum" pel cas de les rates alimentades, però quan s'han administrat dietes amb continguts de proteïna elevats i/ó de forma concentrada en el temps, ó bé no s'observa balanç net intestinal per la glutamina (Rémésy i col., 1978, emprant fins i tot una dieta hipercarbohidratada) ó s'observa un alliberament net (Rémésy i col., 1978 amb una dieta hiper proteica; Yamamoto i col., 1974). Es a dir que quan l'aport de la dieta és suficient, es deuen saturar les vies metabòliques d'utilització de la glutamina, havent-hi, per tant, un excedent que és alliberat a la vena porta.

El destí metabòlic de l'esquelet carbonat de la glutamina en l'intestí és la oxidació a CO_2 principalment, i de forma residual a lactat i altres àcids orgànics, i a alguns aminoàcids com alanina, citrul.lina i prolina principalment. El nitrogen de la glutamina apareix com amoni (un 38% de la glutamina captada), alanina (28%), citrul.lina (24%), prolina (7%) (Windmueller i Spaeth 1978, 1980). Podem interpretar, doncs, les nostres dades considerant que part

de la gran quantitat d'alanina alliberada a la vena porta prové de la metabolització de la glutamina. Amb les nostres dades és impossible saber quanta de l'alanina alliberada prové de la glutamina, perquè no sabem la quantitat real de glutamina metabolitzada, apart de que part també d'aquesta alanina pot provenir del glutamat, que encara que les nostres dades donguin un balanç intestinal no significativament diferent de zero pe aquest aminoàcid (però amb tendència a ésser alliberat) sol ser un dels aminoàcids més abundants en les proteïnes de la dieta (per exemple en la caseïna: Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978). La metabolització de la glutamina ens explica també l'alliberament de citrul.lina que observem i que no podem pensar que vingui de la dieta de forma significativa, donat que no és un aminoàcid que formi part de les proteïnes. Aquest resultat, per altra banda, està plènamet d'acord amb dades obtingudes amb perfusions d'intestí de rata (Windmueller i Spaeth, 1974, 1978, 1980), i en un model similar al nostre (Borsnan i col., 1983). Les dades de Windmueller i Spaeth donen una sortida de citrul.lina de 6.5 umols/hora/100p.c. i les nostres al voltant de 8 umols/hora/100pc. Per tant podem parlar d'una plena coincidència de valors. La citrul.lina és un aminoàcid que es considera precursor d'arginina, aminoàcid aquest que si bé es considera essencial en animals joves (Borman i col., 1946). En adults la biosíntesi pot fer front a les necessitats d'aquest aminoàcid. L'única via biosintètica d'arginina coneguda implica la conversió d'ornitina a citrul.lina (reacció catalitzada per la ornitina carbomoi-transferasa). La citrul.lina a través de dos passos catalitzats per l'argininosuccinat sintetasa i l'argininosuccinat liasa, ret arginina. Aquests enzims són predominantment hepàtics, però l'altíssima activitat arginasa en fetge impedeix que aquest òrgan sigui un productor net d'arginina. S'ha comprovat que el cervell i

els ronyons poden sintetitzar arginina (Ratner, 1973) però tenen una activitat ornitina carbomoiiltransferasa mol baixa (Raijman, 1974) i per tant han d'utilitzar citrul.lina provinent d'altres teixits. Es molt probable, doncs, que l'intestí sigui la principal font de citrul.lina de l'organisme (Windmueller i Spaeth, 1981), la qual serà la base per a la posterior síntesi d'arginina en altres teixits, sobretot en ronyó.

La considerablement gran sortida de taurina que també s'ha descrit en humans postabsortius (Felig i col., 1973) s'ha d'explicar pel seu doble origen: la dieta i la biosíntesi (Spaeth i Schneider, 1974; Huxtable i Lippincott, 1982). El patró de sortida de la resta d'aminoàcids, considerant les variacions degudes a error experimental que impedeixen que algunes dades siguin no diferents de zero, segueix aproximadament el descrit i hem de suposar que reflecteixen la seva composició en la dieta (Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978; Bourdel i col., 1981).

- Paper dels eritròcits en el balanç intestinal d'aminoàcids.

Les nostres dades (fig. IV.1.2) indiquen que els eritròcits tenen un paper tan important com el que pugui tenir el plasma, sense aparentar, en absolut, una subordinació al flux plasmàtic com suggereixen, en el be, Heitmann i Bergman (1980). De fet, el que s'observa és que la contribució dels eritròcits en el balanç intestinal d'aminoàcids és dependent completament de l'aminoàcid en qüestió, essent molt difícil extreure, de les dades que hem obtingut, algun patró de comportament general dels diferents aminoàcids. Només constatem la importància de llur contribució. El que si podem comentar és que el grau de dispersió dels valors de la fracció cel.lular de la sang és

en general més gran que el plasmàtic -la qual cosa segurament es deu a que han estat calculats d'una forma més indirecta que els plasmàtics- que pot tenir com a conseqüència una més gran dificultat per a obtenir diferències significatives respecte el zero, que no per la fracció plasmàtica (vegeu els casos de la treonina, serina, glutamat, glutamina, valina, fenilalanina, histidina i ornitina en la fig. IV.1.2). De qualsevol manera, podem veure que els eritròcits contribueixen, de forma general, a l'alliberament d'aminoàcids per l'intestí. Per altra banda, la manca de bibliografia sobre aquest punt dificulta, evidentment, la discussió en no haver-hi dades per a comparar.

Els nostres resultats difereixen en part dels d'Elwyn i col. (1968). La interpretació de les seves dades -cosa més aviat complicada donat el caràcter continu dels experiments i l'absoluta manca de qualsevol tractament estadístic- porta a concloure que els eritròcits, en gos, i a nivell d'intestí, tendeixen més a tenir en conjunt un paper contrari al plasmàtic, així, l'intestí mentre que allibera els aminoàcids en el plasma, en captaria de la fracció cel.lular de la sang. En els dos estudis s'observa un paper actiu dels eritròcits en el flux intestinal d'aminoàcids, però difereixen en el sentit d'aquesta contribució.

En termes generals, i pel que fa a l'intestí, els nostres resultats es troben més aprop del que s'ha descrit en humans postabsortius (Felig i col., 1973), si bé, existeixen diferències importants en analitzar els aminoàcids de forma individual.

La captació de glutamina que hem comentat anteriorment podem atribuir-la exclusivament al plasma, la qual cosa confirma dades de Windmueller i Spaeth (1974) en intestí de

rata perfundit. Aquesta captació plasmàtica no sembla ésser un cas especial de la rata, ja que també s'observa en humans postabsortius (Felig i col., 1973). L'intestí, per altra banda, tendeix a alliberar glutamina a la fracció corpuscular de la sang (dades no significatives, però) coincidint també amb les observacions de Felig i col. (1973), si bé aquests autors sí que troben un alliberament significativament diferent de zero. De fet, estrictament parlant, nosaltres no observem cap cas en el que es dongui, per a un aminoàcid determinat, papers contraposats (estadísticament significatius) dels eritròcits i del plasma. Si, però, que observem diferències significatives entre un i altre compartiment per diversos aminoàcids: aspartat, asparagina, glutamina, citrul.lina, leucina, tirosina, lisina i arginina.

Es important assenyalar que els aminoàcids majoritàriament alliberats per l'intestí segons les nostres dades (alanina, taurina, glicina, i prolina) ho són als dos compartiments sanguinis de forma pràcticament igual. Això, ho podem incloure en el que comentàvem anteriorment en el sentit que potser en la rata (de la qual no hi ha dades en la bibliografia) els eritròcits tinguin més importància quantitativa en el transport d'aminoàcids entre els òrgans, que en altres espècies com el gos, en humans ó en el be.

Els aminoàcids bàsics menys la citrul.lina, els aromàtics i els ramificats surten de l'intestí majoritàriament, sinó única, via eritròcits, la qual cosa contrasta amb la sortida via plasma de la citrul.lina, dada aquesta última, que també observen Felig i col. (1973) en humans portabsortius i Windmueller i Spaeth (1981) en perfundir amb citrul.lina marcada l'intestí de rata.

Resumint, podriem dir que només pels casos de

l'aspartat, asparagina i citrul.lina, que acabem de comentar, el plasma és l'única via de transport d'aminoàcids de l'intestí al fetge. En tots els altres casos, el flux net d'aminoàcids és la combinació, de formes ben diferents segons l'aminoàcid, dels dos compartiments sanguinis.

V.1.5. Balanç hepàtic d'aminoàcids.

Els nostres resultats del balanç sanguini hepàtic d'aminoàcids (fig.IV.1.3) mostra i confirma un cop més el clar paper del fetge com a tamponador dels nivells d'aminoàcids considerablement alts que provenen de l'intestí en la fase absortiva, fent, com posteriorment comentarem, que el balanç esplàncnic sigui gairebé nul. Aquest paper principalment captador del fetge en estat absortiu està plènamment d'acord amb la bibliografia, i és pràcticament independent, a nivell general, de l'espècie estudiada: en gos (Elwyn i col., 1968), en ovella (Heitmann i Bergman, 1980) i en rata (Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978).

En analitzar els aminoàcids de forma individual, el fet més destacable és la gran captació d'alanina. Aquesta quantitativament gran captació d'alanina és més una conseqüència dels alts nivells d'aquest aminoàcid en la vena porta, en ser produït per l'intestí, que a un transport especialment més alt respecte els altres aminoàcids. Segons els nostres resultats, l'extracció relativa per l'alanina és d'un 15%, (Rémésy i col., 1978, publicaren un 25%), mentre que per exemple per la leucina és d'un 11%. De fet, actualment es considera que el transport d'alanina és el procés limitant en el metabolisme d'aquest aminoàcid en el fetge, si bé, quan hi ha un gran aport d'alanina al fetge (per exemple amb dietes hiperproteiques) el metabolisme s'adapta (disminuint la concentració intrahepàtica d'alanina

lliure) fent que el transport continui essent el procés limitant (Fafournoux i col., 1982, 1983; Christensen, 1983) de forma que l'extracció relativa i absoluta augmenten i, així, els nivells arterials d'alanina romanen molt constants.

Es interessant comentar que, com hem dit anteriorment, aquesta captació d'alanina en estat absortiu es dóna també en gos i en be, però el significat és prou diferent en aquestes dues espècies respecte a la rata.. Tant en el gos com en el be -el gos per la seva ingesta rica en proteïnes i pobre en carbohidrats, el be per absorbir quantitats limitades de glucosa (Wolff i Bergman, 1972)- la via gluconeogènica està sempre activada, i la captació d'alanina té un clar significat gluconeogènic. En canvi en la rata alimentada hem de suposar que aquesta via gluconeogènica estigui inhibida, o al menys en les nostres condicions no estigui gaire potenciada, amb la qual cosa es mostra d'una forma més clara el paper del fetge com a tamponador dels nivells circulants d'aminoàcids.

Per altra banda, el metabolisme hepàtic de l'alanina està associat a la ureogènesi (Phromphetcharat i col., 1981) de forma que l'alanina es considera com un transportador de l'amoni, generat en el metabolisme d'aminoàcids en els diferents teixits, al fetge per a la seva conversió en urea com a forma d'eliminar la toxicitat que representa l'amoni lliure (Aikawa i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; McDonald i col., 1976; Brosnan i col., 1983 entre d'altres).

No obstant aquest ampli consens respecte a que una captació hepàtica d'alanina es correlaciona amb una activa ureogènesi, nosaltres observem una clara exportació de glutamina pel fetge. La bibliografia mostra que en general el fetge capta o simplement no té un balanç net de glutamina

(Yamamoto i col., 1974; Phromphetcharat i col., 1981; Brosnan i col., 1983; Welbourne i col., 1986), si bé en rates dejunades s'ha descrit un alliberament de glutamina pel fetge (Aikawa i col., 1973). Una sortida de glutamina del fetge està més aviat associada, i només en casos crònics, a estats d'acidosi metabòlica, situació en la qual hi ha una sèrie d'adaptacions que dirigeixen la glutamina cap el ronyó, el qual, per a compensar la disminució del pH sanguini, excretarà amoni provinent de la glutamina (Welbourne i col., 1986). En la nostra situació, però, no tenim un estat d'acidosi, com ens demostren les mesures de pH sanguini, ni, com més endavant comentarem, observem captació de glutamina pel ronyó. No obstant, potser no és un resultat tan estrany ja que Rémésy i col. (1978) en rates alimentades amb una dieta hipercarbohidatada també troben una sortida hepàtica de glutamina. Malhauradament, no en fan cap comentari.

Es difícil amb les dades que tenim donar una explicació a la producció hepàtica de glutamina. Una possibilitat fóra que l'amoni captat pel fetge servís per a la síntesi de glutamina. En aquest sentit s'ha descrit que si bé l'alanina indueix la ureogènesi, l'amoni suporta la síntesi de glutamina (Phromphetcharat i col., 1981). Si ens basem en les dades de Rémésy i col. (1978) de la concentració portal d'amoni (que nosaltres no hem mesurat) i apliquem les nostres dades de flux sanguini portal, veiem que el fetge reb aproximadament uns 1680 nmols/min. d'amoni. Segons aquests autors hi ha una captació relativa d'amoni del 77%, per tant podem calcular que el fetge captaria aproximadament uns 1290 nmols/min. d'amoni. Aquests resultats de Rémésy i col. (1978) -concentració portal d'amoni de 120 μ M i una captació relativa del 75%- corresponen a rates alimentades amb dietes hipercarbohidratades que tenen un 13% de proteïnes, però en augmentar el % de proteïnes de la dieta,

augmenten tant la concentració en vena porta d'amoni com seva extracció relativa. Així, per una dieta del 50% de proteïnes s'arriba a una concentració en vena porta de 220 μM i una captació relativa del 90%, amb la qual cosa i suposant que el flux no varia, el fetge captaria uns 2770 nmols/min. La dieta que reben els nostres animals té un 17% de proteïnes. Aquests valors ens mostren que suposant que tot l'amoni captat fos emprat per a la formació de glutamina, aquest amoni pot formar entre un 60 i el 100% de la glutamina alliberada, suposant en aquesta estimació que es necessiten dos amonis per a formar una glutamina. Però podem pensar que part del nitrogen de la glutamina formada pot provenir de l'alanina captada en transaminar-se i formar glutamat. En aquest sentit, s'ha descrit en hepatòcits aïllats de rata alimentada que un 60% del nitrogen produït en la metabolització de l'alanina ret urea, quedant per tant un 40% de nitrogen que és reutilitzat (Pastor-Anglada i col., 1986) podent col.laborar, doncs, a la síntesi de glutamina. No coneixem, però, els motius de les discrepàncies entre els nostres resultats (i els de Rémésy i col., 1978) i la resta de bibliografia.

Pel que respecte a d'altres aminoàcids podem veure que el fetge capta considerables quantitats de glicina i prolina, els quals són alliberats per l'intestí de forma principal, i donat l'estat absortiu dels animals hem de suposar que el seu destí és la oxidació i la síntesi de proteïnes (Rémésy i col., 1983).

La citrul.lina, que prové de l'intestí (Windmueller i Spaeth, 1974, 1978, 1980) és captada pel fetge en la mateixa proporció que és alliberada per l'intestí (fig.IV.1.1 i IV.1.3). Aquesta captació, però, no es correspon amb les dades de Windmueller i Spaeth (1981), els quals interpreten que la citrul.lina seria la font per a la síntesi d'arginina

en el ronyó principalment, mentre que el fetge no la captaria significativament. No coneixem els motius d'aquestes diferències.

Els aminoàcids ramificats (valina, leucina i isoelucina) són també captats pel fetge, pràcticament en la mateixa proporció en que són alliberats per l'intestí (fig.IV.1.1 i IV.1.3). En estat absortiu, s'ha descrit que el fetge capta aminoàcids ramificats tant amb dietes hipercarbohidratades com amb dietes hiperproteiques (Rémésy i col., 1978) així com amb dietes "normals" (Pastor-Anglada i Remesar, 1986). Ja que s'ha descrit que seria el múscul més que no el fetge el lloc principal en la transaminació dels aminoàcids ramificats -primer pas per a la posterior oxidació dels cetoàcids resultants- (Goldberg i Odessey, 1972), aquesta captació hepàtica pot ser explicada per un increment en la síntesi de proteïnes, sincronitzat amb l'absorció de la dieta (Lardeux i col., 1978) i una aminoacidèmia portal alta (Bourdel i col., 1981). La captació d'aminoàcids ramificats és però més baixa en % (captació relativa) que la dels altres aminoàcids, tant amb dietes hipercarbohidratades com amb hiperproteiques (Rémésy i col., 1978), la qual cosa permet cobrir les necessitats hepàtiques i alhora les dels teixits perifèrics, on s'incorporaran a proteïnes o seran transaminats. L'alta capacitat del múscul per a transaminar els aminoàcids ramificats junt amb les taxes d'oxidació dels cetoàcids corresponents més alta en fetge ha fet pensar en la possibilitat d'un flux contraposat d'aminoàcids ramificats-cetoàcids de forma que els aminoàcids ramificats arribarien al múscul on serien transaminats, i els cetoàcids resultants serien exportats al fetge on serien finalment oxidats (Hutson i col., 1978; Spydevold i Hokland, 1983; Wagenmakers i col., 1985).

Els aminoàcids aromàtics són bastant eficientment extrets pel fetge en rates alimentades (fig.IV.1.3; Rémésy i col., 1978), essent el seu destí metabòlic la oxidació principalment, havent-se trobat que els nivells d'aquests aminoàcids són els principals reguladors de la pròpia via catabòlica (Salter i col., 1984). La importància del fetge en el metabolisme dels aminoàcids aromàtics es posa de manifest en casos de malfuncionament hepàtic com la cirrosi. En aquesta situació els nivells d'aminoàcids aromàtics augmenten (Munro i col., 1975; Fernstrom i col., 1979). Això té com a conseqüència un amjor entrada d'aquests aminoàcids al cervell, i per tant un augment en la producció de serotonina i catecolamines (Munro i col., 1982).

- Paper dels eritròcits en el balanç hepàtic d'aminoàcids.

Si en el cas del balanç intestinal d'aminoàcids els eritròcits tenien un paper en general similar al plasmàtic (vegeu fig.IV.1.2), l'estudi de la contribució dels eritròcits en el balanç hepàtic ens mostra considerables diferències d'ambdós compartiments sanguinis (fig.IV.1.4). Un primer cop d'ull a la gràfica ens mostra que el fetge capta aminoàcids únicament de la fracció plasmàtica de la sang, només amb l'excepció de la tirosina, aminoàcid que és captat dels dos compartiments sanguinis. Contràriament, tots els aminoàcids alliberats pel fetge ho són a la fracció corpuscular de la sang amb la sola excepció de la glutamina, que ho és en els dos compartiments. Unicament, però, per taurina, aspartat i asparagina es donen papers contraposats significatius de les dues fraccions sanguinies. Així, el fetge capta significativament aquests tres aminoàcids de la fracció plasmàtica de la sang però n'allibera en els eritròcits, de forma que el balanç hepàtic d'aquests aminoàcids és nul (fig.IV.1.3).

Mirat des d'un punt de vista general, les nostres dades recorden el que proposaven Elwyn i col. (1968) en el sentit de que el fetge exportaria aminoàcids en els eritròcits i els captaria del plasma. El que nosaltres no podem saber, amb els nostres resultats, és fins a quin punt aixó és una característica intrínseca del fetge, és a dir, si es donaria de forma general en qualsevol situació, ó si pot també, en altres situacions, captar de forma general aminoàcids dels eritròcits.

Com hem comentat pel cas de l'intestí, existeix molt poca bibliografia sobre la contribució dels eritròcits en el balanç hepàtic d'aminoàcids. Pràcticament, de dades directes només disposem de les d'Elwyn en gossos, ja que altres treballs realitzats sobre el paper dels eritròcits, no contemplen el fetge sinó el llit esplàncnic en global, com és el cas per exemple de Felig i col. (1973) en humans postabsortius. A partir de les seves dades del balanç esplàncnic i intestinal podem estimar en algun grau què succeeix a nivell de fetge, i observem que la captació hepàtica és general per pràcticament tots els aminoàcids. Aquesta captació es realitza indistintament de les dues fraccions sanguínies. Obviament, no podem dir si les diferències amb les nostres dades es deuen a característiques específiques ó si l'estat postabsortiu implica canvis en les característiques de captació per part del fetge. No obstant, les dades de Heitmann i Bergman (1980) en be alimentat, mostren que el paper dels eritròcits en aquesta espècie té el mateix significat que el plasmàtic. Tot això ens fa pensar que en la rata, i de forma semblant al gos, els eritròcits tindrien un paper més independent al plasma que en humans ó en el be.

Malgrat sigui difícil obtenir un patró de comportament clar dels diferents aminoàcids, les nostres dades ens

permeten observar que aquells aminoàcids que presenten una sortida del fetge via eritròcits, són precisament els que presenten una relació de concentració en els eritròcits/concentració plasma més alta, que per altra banda, són aquells que "in vitro" presenten una més gran dificultat de transportar-se a través de la membrana eritrocitària; mentre que els que "in vitro" s'equilibren més ràpidament (aminoàcids ramificats principalment), sembla que "in vivo", en fetge, els eritròcits no hi juguin cap paper: ni són captats de, ni són alliberats a, la fracció corpuscular de la sang. Aquests resultats, a més a més, contrasten amb els resultats trobats pel balanç intestinal, on veiem (fig.IV.1.2) que els aminoàcids ramificats i aromàtics eren alliberats per l'intestí a la fracció corpuscular de la sang de forma gairebé única. Totes aquestes variacions ens fan suposar que no és massa probable que l'explicació dels mecanismes implicats en el transport d'aminoàcids entre els òrgans via els eritròcits, estigui en la consideració de mecanismes generals a nivell de tot l'organisme. Malgrat que sigui impossible amb els nostres resultats arribar a cap tipus de conclusió sobre els mecanismes implicats, creiem que aquests són més complexos del que s'ha suggerit fins ara (Elwyn i col., 1972).

V.1.6. Balanç esplàncnic d'aminoàcids.

El balanç esplàncnic d'aminoàcids ha d'ésser, òbviament, la combinació dels balanços intestinal i hepàtic. Si recordem el que hem comentat d'aquests dos balanços: una sortida general d'aminoàcids de l'intestí i una captació general hepàtica, és lògic observar que el llit esplàncnic mostri, per a la majoria d'aminoàcids un balanç nul, si bé existeix una certa tendència a l'alliberament en la majoria d'aminoàcids (fig.IV.1.5), resultat que mostra d'una forma molt clara el paper tamponador del fetge al que hem aludit

de forma reiterada en aquesta memòria.

De fet, però, s'ha observat que després d'una ingesta de proteïnes el balanç esplàncnic és negatiu, és a dir que hi ha una exportació d'aminoàcids, en superar l'alliberament intestinal a la captació hepàtica, tant en gossos (Elwyn i col., 1968; Bloomgarden i col., 1981) com en humans (Wharen i col., 1976; Aoki i col., 1976), sobretot pels aminoàcids ramificats, i sovint amb una captació d'alanina i glutamina. El balanç esplàncnic negatiu, però, en poc temps va tendint a ser positiu, en disminuir l'aport intestinal i ser superat aquest per la captació hepàtica, de forma que hi ha d'haver un aport dels teixits extraesplàncnics. El temps que dura la sortida esplàncnica després d'una ingesta proteica sembla ésser més llarg en humans que en gos (Bloomgarden i col., 1981). El fet d'aquesta total dependència del balanç esplàncnic d'aminoàcids amb la ingesta fa que resulti molt difícil intentar establir comparacions directes entre els nostres resultats i els bibliogràfics, més encara si tenim en compte que la majoria de treballs ó bé han estat realitzats en estats postabsortius (Felig i col., 1973), ó inclòs dejuni, ó bé els que es poden considerar absortius han estat realitzats després d'una ingesta concentrada en el temps i rica en proteïnes (Yamamoto i col., 1974; Wharen i col., 1976; Révész i col., 1978), mentre que les nostres dades provenen de rates que s'han mantingut amb el seu ritme d'ingesta natural (en estar "ad libitum"), i per tant l'absorció és més dispersa en el temps.

El paper del llit esplàncnic com a regulador dels nivells circulants d'aminoàcids s'ha posat de manifest en un recent treball en el qual s'estudià la disposició d'aminoàcids infundits de forma perifèrica en humans (Gelfand i col., 1986), observant-se que els teixits del llit esplàncnic (fetge i intestí) extreuen de la circulació

un 70% dels aminoàcids infundits, essent la major part de la resta aminoàcids ramificats, els quals són captats pel múscul. D'aquest treball es pot concloure, doncs, que la importància del llit esplàncnic com a regulador de la homeostasi aminoacídica no és tan sols una conseqüència de la seva situació anatòmica - el lloc primer en rebre els aminoàcids de la dieta- sinò que correspon a les seves capacitats metabòliques.

Les nostres dades mostren una sortida significativa d'aspartat, asparagina, glutamat i metionina. En els tres primers casos es deu a una suma de tendències a alliberar aquests aminoàcids per part de l'intestí i del fetge, les quals es fan significatives en el balanç esplàncnic. Tant l'aspartat com l'asparagina són aminoàcids que no se'ls hi reconeix cap paper mínimament important en el flux interòrgans d'aminoàcids, si bé són força importants en el metabolisme intracel.lular (Aikawa i col., 1973; Felig i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978, Brosnan i col., 1983 entre d'atres), no quedant, doncs, clar el significat d'aquestes exportacions del llit esplàncnic. La possibilitat de que la sortida de glutamat estigui relacionada amb un possible cicle glutamat-glutamina, segons el qual el glutamat seria captat pel múscul i alliberat d'aquest teixit en forma de glutamina (Felig i col., 1973b; Heitmann i Bergman, 1980) es correspon amb les dades del balanç perifèric que hem obtingut i que més endavant comentarem.

La captació que observem d'aminoàcids aromàtics correspon a una captació hepàtica més alta que l'alliberament intestinal. Aquesta captació esplàncnica implica que hi ha d'haver un aport d'aquests aminoàcids d'altres teixits no esplàncnics. Per altra banda, els aminoàcids aromàtics no són gaire significatius en els

fluxos interòrgans d'aminoàcids per la gran metabolització hepàtica que tenen (Salter i col., 1984), si bé en humans postabsortius si que s'observa un petit flux dels teixits musculars cap el lli esplàncnic (Felig, 1975).

El balanç esplàncnic nul de la glutamina ve donat per la compensació de la captació intestinal amb la producció hepàtica. Ja hem comentat el caràcter més aviat excepcional de l'exportació hepàtica de glutamina. El resultat més corrent a la bibliografia és trobar un balanç esplàncnic de captació d'aquest aminoàcid, ja sigui perquè l'intestí en capta i el fetge té un balanç nul (Brosnan i col., 1983) ó també en capta (Felig i col., 1973), ja sigui perquè l'intestí no en capta de forma neta de la circulació -per haver-hi un aport important de la dieta- metre que sí que ho fa el fetge (Rémésy i col., 1978, dieta hiperproteica). Sigui com sigui, el resultat en general és d'una captació esplàncnica de glutamina, que ha d'ésser compensada per un aport perifèric (múscul principalment) (Felig i col., 1973; Wharen i col., 1976; Rémésy i col., 1978; Brosnan i col., 1983 entre d'altres), teixit, el múscul, que n'allibera sempre, independentment de l'estat nutricional de l'animal com més endavant comentarem, i la qual té un paper de transport de l'amoni format en aquests teixits, com a conseqüència del metabolisme nitrogenat, cap al fetge on pot formar urea (per captació hepàtica directa, i mitjançant la glutaminasa, i per prèvia captació intestinal on es converteix en alanina i amoni lliure principalment, els quals són captats pel fetge). Una excepció a aquest flux de glutamina del múscul al llit esplàncnic és la situació d'acidosi. En aquesta situació s'ha comprovat que el llit esplàncnic pot ser un exportador net de glutamina (Schrock i Goldstein, 1981; Welbourne i col., 1986) contribuint així al flux de glutamina cap el ronyó.

-Paper dels eritròcits en el balanç esplàncnic d'aminoàcids.

Havíem vist anteriorment que existia una important aortida d'aminoàcids via eritròcits i via plasma de l'intestí (fig.IV.1.2) mentre que el fetge tendia a captar aminoàcids de la fracció plasmàtica i a alliberar-ne als eritròcits (fig.IV.1.4). De la combinació d'aquests dos comportaments, el que s'hauria d'observar és una captació d'aminoàcids del plasma i un alliberament a la fracció corpuscular de la sang pel llit esplàncnic. I això és el que hem obtingut (fig.IV.1.6). Per alguns aminoàcids observem que el balanç esplàncnic sanguini nul és la conseqüència de comportaments contraposats de les dues fraccions sanguínies, essent els casos més clars els de la glutamina i lisina. Aquest paper contraposat del plasma i dels eritròcits pel cas de la glutamina sembla, doncs, que és més general que per altres aminoàcids, i és un dels casos en que la bibliografia es posa més d'acord en aquest sentit. Recordem per exemple que en humans postabsortius el paper dels eritròcits s'ha descrit que té el mateix sentit que el del plasma amb l'única excepció de la glutamina (Felig i col., 1973), si bé en aquest cas es referia al balanç intestinal i hepàtic.

La tendència a que la sortida d'aminoàcids del llit esplàncnic sigui majoritàriament via els eritròcits mentre que la captació es realitzi del plasma, ens torna a recordar el que hipotetitzaven Elwyn i col. (1968, 1972) en el gos, en el sentit de donar al transport d'aminoàcids via eritròcits un significat independent al que té el transport plasmàtic. Analitzant les nostres dades, es podria pensar que el flux d'aminoàcids del llit esplàncnic cap els teixits perifèrics és mitjançat pels eritròcits i que el transport d'aminoàcids dels teixits perifèrics cap el llit esplàncnic és mitjançat principalment pel plasma.

Els aminoàcids ramificats i aromàtics presenten una clara captació plasmàtica amb una contribució eritrocitària nul·la. Aquest comportament és diferent del que succeeix en humans postabsortius, on s'ha descrit una important contribució dels eritròcits en la captació esplàncnica d'aminoàcids, sobretot pels aminoàcids ramificats (Felig i col., 1973).

Com en els casos del fetge i intestí, és difícil donar un patró de conducta que agrupi els aminoàcids segons siguin transportats via eritròcits o via plasma. En el cas del llit esplànnic la sortida d'aminoàcids via eritròcits és més clara i important pels aminoàcids que presenten una relació concentració intraeritrocitària/concentració en plasma més alta. Hem de pensar, doncs, que aquest guany net d'aminoàcids per part dels eritròcits en passar pel llit esplànnic es realitza contra gradient, -i en alguns casos com glutamat i taurina amb una concentració eritrocitària unes 9 vegades la plasmàtica- si fos del plasma d'on captessin aminoàcids els eritròcits. La situació, però, seria diferent si els eritròcits captessin els aminoàcids directament dels teixits, com proposen Elwyn i col. (1966, 1968, 1972), ja que la concentració tissular d'aminoàcids és molt més alta que la plasmàtica (Adibi i col., 1973 entre molts d'altres), i a més a més, podrien existir "micropools" d'aminoàcids amb unes concentracions determinades que podrien facilitar aquesta captació pels eritròcits. Sigui com sigui, no són gens clars els mecanismes implicats en l'existència de comportaments diferents del plasma i dels eritròcits pel que fa al transport d'aminoàcids.

V.1.7. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena il·líaca.

Els resultats obtinguts del balanç sanguini d'aminoàcids

dels teixits drenats per la vena il·líaca ens mostren que hi ha una exportació generalitzada d'aminoàcids mentre que són captats els aminoàcids ramificats (fig.IV.1.7). Dels teixits drenats per la vena il·líaca -principalment múscul, teixit adipós i pell- es considera que és el múscul qui predomina, tant per la seva proporció en massa, com pel seu actiu metabolisme (Aikawa i col., 1973; Goldberg i Chang, 1978; Cahill i col., 1981 entre d'altres). No obstant, degut a problemes metodològics és realment difícil esbrinar la contribució quantitativa que puguin tenir la pell i el teixit adipós.

Les dades obtingudes suggereixen l'existència d'un cert estat proteolític muscular que expliqui la tendència general a l'exportació d'aminoàcids (amb l'excepció dels ramificats). Aquesta situació d'alliberament d'aminoàcids la observem en el mateix moment en que el llit esplàncnic es troba en un balanç pràcticament nul per a la majoria d'aminoàcids, i per tant, contràriament al descrit per la bibliografia sembla que ni hi hagi una sincronització entre els teixits perifèrics i el llit esplàncnic. Es probable que un dels motius d'aquesta aparent desincronització resideixi en la mesura del balanç esplàncnic, on l'alt flux sanguini comporta que petites captacions no detectades com a tals siguin en realitat quantitativament importants. En aquest sentit cal destacar que la mesura del balanç esplàncnic plasmàtic dóna una clara tendència a la captació d'aminoàcids.

Sigui com sigui, una exportació perifèrica d'aminoàcids ha d'ésser conseqüència d'una manca d'aport suficient d'aminoàcids exogens, per a suportar les necessitats hepàtiques principalment. Aquesta manca d'aport, però, no sembla ser general per a tots els aminoàcids donat que observem una captació significativa d'aminoàcids ramificats

pels teixits perifèrics, la qual cosa considerem com a una situació contradictòria, sense poder donar-li una explicació calra. Hem d'insistir, però en un punt comentat anteriorment i que fa referència al caràter clarament continu en el temps entre un estat de balanç nètament captador i un estat de balanç nètament exportador, amb la qual cosa és possible que el moment en que s'obtingueren les mostres fos de transició entre un estat i l'altre. Les úniques dades bibliogràfiques directament comparables, realitzades en rata i en un estat, almenys en teoria, absortiu, ens mostren un balanç perifèric bàsicament nul, però amb tendència a l'exportació d'aminoàcids, excepte pels aminoàcids ramificats (Brosnan i col., 1983). En aquest treball que acabem de citar, el nombre d'animals emprats és únicament de 4, la qual cosa es tradueix en un elevat error estandar i, per tant, en una manca de significacions estadístiques respecte al zero, trobant únicament diferències significatives per la sortida de glutamina i glicina. Les nostres dades s'han obtingut amb un nombre d'animals considerablement més gran (8-10 animals), i per tant els nostres errors són més petits, augmentant d'aquesta manera les significacions estadístiques. Podriem dir, doncs, que els nostres resultats estan bàsicament d'acord amb els de Brosnan i col. (1983). En ambdós casos, s'observa una important sortida de glutamina i glicina, mentre que hi ha una captació d'aminoàcids ramificats (significativa en el nostre cas) com a dades més destacables.

El múscul és un teixit amb una alta capacitat per a metabolitzar aminoàcids ramificats (Goldberg i Chang, 1978; Spydevold i Hokland, 1983; Wagenmawers i col., 1985; Gelfand i col., 1986), capacitat que li ve donada per l'alta activitat transaminàsica d'aminoàcids ramificats que presenta (Hutson i col., 1978) i la gran massa d'aquest teixit respecte el total de l'organisme (40%) que li

confereix una gran importància quantitativa en el catabolisme dels aminoàcids ramificats *(Hutson i col., 1978; Spydevold i Hokland, 1983), i de fet es considera que és el múscul el que regula els nivells circulants d'aquests aminoàcids (Kadowaki i col., 1984; Gelfand i col., 1986).

La metabolització dels aminoàcids ramificats en el múscul produeix amoni que si s'acumula pot ser tòxic per a l'organisme. A diferència del fetge, el múscul no té els enzims necessaris per a la conversió de l'amoni en urea (Goldberg i Chang, 1978 entre altres). Estudis inicials de diferències arteriovenoses d'aminoàcids a través del teixit muscular mostraren que en estats postabsortius i de dejuni la sortida d'aminoàcids que s'observava no era un simple reflex de la composició en aminoàcids de les proteïnes musculars, ja que tant l'alanina com la glutamina eren alliberades a unes taxes molt més altes que les que els hi corresponien segons la seva abundància en les proteïnes (Felig, 1975), i per tant aquests dos aminoàcids han d'ésser sintetitzats "de novo" en el múscul. Per la seva síntesi s'utilitza l'amoni generat en el metabolisme d'aminoàcids, principalment ramificats (Goldberg i Chang, 1978; Snell, 1980) la qual cosa els dóna un clar paper en el transport d'amoni cap al fetge i al ronyó (Aikawa i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; Felig, 1975; Munro, 1982 entre d'altres).

L'origen de l'esquelet carbonat de l'alanina continua essent matèria àmpliament debatuda pel que respecte a la contribució que puguin tenir diferents aminoàcids (glutamat, aspartat, asparagina, valina i isoleucina principalment), via la seva conversió a piruvat (Goldberg i Chang, 1978; Snell, 1980; Caldecourt i col., 1985 entre d'altres). On si que hi ha més acord és en l'existència d'una clara relació entre el metabolisme de la glucosa i de l'alanina, de forma que ,

almenys "in vivo", la sortida d'alanina del múscul s'incrementa en estats de postabsorció i dejuni (Aikawa i col., 1973; Felig i col., 1973; Felig, 1975) i també amb l'administració de glucagó (Smith, 1986), la qual cosa sembla indicar que una augmentada captació hepàtica, i conseqüentment, una devallada en els nivells circulants d'alanina seria el senyal per a una augmentada exportació muscular d'alanina, mentre que disminueix amb l'administració de glucosa (Elia i col., 1985). La sortida muscular de glutamina no s'altera ni amb l'administració de glucagó ni de glucosa i, en canvi, augmenta molt en situacions d'acidosi metabòlica crònica mentre que, en aquestes situacions, no ho fa l'alanina (Schrock i col., 1980; Smith, 1986). Aquestes dades semblen indicar una major independència de la glutamina del metabolisme carbohidratat, i per tant, una funció diferent pels dos aminoàcids. Les nostres dades es poden interpretar en aquest sentit. En situació absorptiva trobem un balanç nul d'alanina mentre que hi ha una exportació de glutamina, la qual transportarà l'amoni generat en el catabolisme dels aminoàcids ramificats dels quals observem captació significativa.

- Paper dels eritròcits en el balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena ilíaca.

Els fluxos d'aminoàcids en sang dels teixits drenats per la vena ilíaca són menors quantitativament parlant dels que observàvem pels teixits del llit esplàncnic, i per tant el flux via les fraccions sanguínies és també menor (fig.IV.1.8). Els resultats obtinguts ens mostren que existeix una tendència general -amb l'excepció de la glutamina, citrulina i metionina- a un comportament força similar de les dues fraccions sanguínies en el transport d'aminoàcids a través d'aquests teixits.

Existeix molt poca bibliografia sobre el transport d'aminoàcids via eritròcits en els teixits perifèrics. Tant en humans postabsortius (Felig i col., 1973; Aoki i col., 1973) com en ovelles dejunades (McCormick i Webb, 1982) els eritròcits contribueixen a l'alliberament general d'aminoàcids dels teixits perifèrics que s'esdevé en aquestes situacions, sense observar-se papers contraposats per a les dues fraccions sanguínies. Es cal, doncs, que les cèl.lules sanguínies contribueixen també en aquests teixits al transport d'aminoàcids, si bé, almenys en les nostres condicions, semblen fer-ho de forma diferent al que veiem pel fetge ó pel llit esplàncnic, la qual cosa ens indica la manca d'homogeneïtat d'aquest transport, i, per tant, dóna peu a pensar en l'existència de mecanismes, ó de regulació d'aquests mecanismes, diferents segons el teixit, almeys en la rata.

V.1.8 Balanç renal d'aminoàcids.

Ja hem comentat a la introducció que el balanç net d'aminoàcids a través del ronyó és molt petit en situacions de no acidosi com les nostres i d'acord amb això, apenes observem, amb les nostres dades, captacions ó alliberaments d'aminoàcids (fig.IV.1.9), tal i com han descrit diferents autors en diferents espècies no remugadores (Owen i Robinson, 1963; Yamamoto i col., 1974; Tizianello i col., 1980; Brosnan i col., 1983). En situacions d'alimentació absortives el ronyó té una clara tendència a captar aminoàcids de la circulació (fig.IV.1.9), dades que estan bàsicament d'acord amb el descrit per la rata, en plasma (Yamamoto i col., 1974), si bé, dades referents a sang total en rates en les mateixes condicions que les nostres, mostren un balanç nul per tots els aminoàcids, amb l'excepció d'una captació de glutamat i glicina i un alliberament de serina (Brosnan i col., 1983).

En espècies no remugadores s'ha descrit que el ronyó pot ésser un controlador dels nivells circulants de serina, doncs s'ha observat que la concentració plasmàtica de serina disminueix en animals amb insuficiència renal (Tizianello i col., 1980; Kopple i Fukuda, 1980). Aquesta serina prové de la glicina que en aquestes espècies capta el ronyó (Felig i col., 1973; Yamamoto i col., 1974; Tizianello i col., 1980; Brosnan i col., 1983), conversió, aquesta, demostrada per Pitts i col. (1970).

En animals remugadors s'ha comprovat que el ronyó allibera tant serina com glicina a la circulació en situacions d'alimentació (Bergman i Heitmann, 1978; Heitmann i Bergman, 1980) sense ésser clar quin és el seu origen.

Dins d'aquest context de poca influència del ronyó sobre els nivells circulants d'aminoàcids en situacions d'alimentació, s'ha comprovat la capacitat d'aquest òrgan de catabolitzar aminoàcids ramificats (Adibi, 1976), així com també se li ha donat importància en la síntesi d'arginina a partir de la citrulina (Featherston i col., 1973) la qual provindria de l'intestí (Windmueller i Spaeth, 1981). Les nostres dades, però, mesurades com a balanços sanguinis no ens permeten corroborar les idees abans esmentades, a part de donar-li al ronyó una certa capacitat metabolitzadora d'aminoàcids ramificats i aromàtics.

-Paper dels eritròcits en el balanç renal d'aminoàcids.

El primer que cal destacar en observar la gràfica IV.1.10 de la contribució de les dues fraccions sanguínies en el balanç renal d'aminoàcids és l'amplitud dels moviments de la fracció eritrocitària comparada amb la plasmàtica, i la grandària dels errors estandar d'aquestes dades que impedeixen el detectar diferències estadístiques per

nombrosos casos. Hem de dir també que no existeixen dades bibliogràfiques sobre la possible contribució dels eritròcits en el balanç renal d'aminoàcids, amb l'única excepció de glutamat i glutamina. Dades obtingudes en gos acidòtic i control mostren la nul·la contribució dels eritròcits en la captació de glutamina pel ronyo (Vinay i col., 1985). En rata s'ha observat tant que el ronyó capta glutamina dels eritròcits (Vinay i col., 1985) com s'ha negat aquesta possibilitat (Squires i col., 1976).

Bàsicament, la fracció plasmàtica de la sang és la responsable de les captacions dels aminoàcids que havíem vist captats en la mesura en sang total. Per altra banda, és de destacar que hi ha una captació de glicina de la fracció corpuscular de la sang i un alliberament en la mateixa quantitat de serina en la fracció plasmàtica, la qual cosa ens fa tornar a considerar l'existència de la conversió de glicina en serina que comentàvem anteriorment, i que d'altres autors havien observat en fer diferències arteriovenoses a través del ronyó (Yamamoto i col., 1974; Tizianello i col., 1980; Felig i col., 1969; Brosnan i col., 1983) entre d'altres). També és important la sortida de glutamina via eritròcits -malgrat que el balanç sanguini sigui nul per l'increment de l'error de la mesura- donat que ha estat descrit que el ronyó de rates no acidòtiques és un lloc d'activa síntesi de glutamina (Janicki i D.Goldstein, 1969), fent suposar, aquestes dades, que existeix un alliberament unidireccional d'aminoàcid sintetitzat cap a una de les dues fraccions sanguínies: serina a plasma i glutamina a eritròcits. En conjunt, doncs, sembla existir una contribució dels eritròcits al transport d'aminoàcids a través del ronyó, si bé aquesta contribució és diferent segons l'aminoàcid.

V.1.9. Balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular

Existeixen molt poques dades sobre el metabolisme d'aminoàcids en el cervell "in vivo", i les que hi ha provenen d'estudis realitzats amb mesures de diferències arteriovenoses emprant la vena jugular, és a dir que s'associen els teixits drenats per aquesta vena amb el cervell (Cahill i col., 1981; Brosnan i col., 1983). No hem trobat, però cap dada que demostrï que la participació de múscul i de teixit adiós en aquests resultats sigui mensyspreable.

Es considera que -de forma al que succeïa en el ronyó però més acusat- la contribució del cervell a la homeostasi aminoacídica és negligible (Aoki i col., 1981) el qual presenta en situacions normals balanços nuls per a tots els aminoàcids (Aoki i col., 1981; Brosnan i col., 1983). Les nostres dades mostren que en les condicions estudiades hi ha una significativa captació d'aminoàcids aromàtics (fenilalanina), de ramificats (valina, isoleucina i leucina) i de glicina.

La captació d'aminiàcids pel cervell (a través de la barrera hematoencefàlica) sembla ser pels aminoàcids neutres (tirosina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofan, leucina, isoleucina i valina) dependent de la concentració en plasma, existint competició entre ells per a un mateix sistema de transport (Olendorf i Szabo, 1976). Aquesta característica sembla ser la responsable de que en casos de diabetis hi hagi un increment en la captació d'aminoàcids ramificats i de la seva concentració en cervell de rata, mentre que disminueix la concentració d'aminoàcids aromàtics en el cervell (Brosnan i col., 1983, 1984).

El destí metabòlic dels aminoàcids ramificats captats és probablement la oxidació, ja que s'ha demostrat aquesta capacitat en talls de cervell (Chaplin i col., 1976), i s'ha descrit la presència, en diferents regions de cervell, d'activitat transaminasa dels aminoàcids ramificats i deshidrogenasa dels cetoàcids dels aminoàcids ramificats (Brosnan i col., 1985).

-Paper dels eritròcits en els balanç d'aminoàcids dels teixits drenats per la vena jugular.

Les nostres dades (fig.IV.1.12) no mostren significacions clares pel transport d'aminoàcids via eritròcits a través dels teixits drenats per la vena jugular, si bé, en la majoria de casos es veu una tendència (no significativa) amb major o menor grau a transportar aminoàcids en la mateixa direcció que el plasma, amb les excepcions de la citrul.lina (únic cas en que trobem una diferència estadística entre les dos compartiments sanguinis), lisina, metionina i glicina, si bé aquests només mostren tendències no significatives.

Com el cas del ronyó, hem obtingut uns errors estadístics relativament alts, degut principalment al quantitativament poc important moviment d'aminoàcids que hi ha a través d'aquests dos teixits. Poques conclusions podem extreure, doncs del paper dels eritròcits en el transport d'aminoàcids a través dels teixits drenats per la vena jugular en les nostres condicions, si bé s'ha descrit (única referència bibliogràfica existent) que en cervell perfundit de gos, els eritròcits estarien involucrats en el transport d'asparagina, glutamat, histidina, metionina, serina, treonina i tirosina (Drewes i col., 1977), però les condicions de perfusió són tals que hi ha una sortida generalitzada d'aminoàcids, la qual cosa no ens permet considerar-la com a situació comparable

V.1.10. Consideracions globals.

L'ús de la situació absorptiva com a única situació fisiològica estudiada implica que els fluxos d'aminoàcids, tal i com hem observat, vagin dirigits de l'intestí als demés teixits. Per tant, l'estudi de la contribució dels eritròcits a aquests fluxos és necessàriament parcial. Desconeixem, si, en la rata, en situacions en les que els fluxos d'aminoàcids siguin dels teixits perifèrics al llit esplàncnic, com podria ésser un dejuni, els eritròcits tindrien una altra contribució. Es a dir, si el paper dels eritròcits és dependent de la situació concreta.

Hem comprovat que, en les nostres condicions, el paper dels eritròcits és, en general, tant important quantitativament com el plasmàtic, i sembla molt més clar pels teixits esplànncics que en els perifèrics, segurament per tenir uns fluxos d'aminoàcids més grans.

Es difícil extreure conclusions concretes sobre la participació dels eritròcits al transport interòrgans d'aminoàcids si mirem els comportaments dels aminoàcids individuals, ja que s'observa una absoluta variabilitat segons el teixit. És més indicatiu mirar-ho per teixits. Si ho fem així, podem veure que l'intestí no distingeix entre plasma i eritròcits a l'hora d'alliberar aminoàcids (sempre mirat com a tendència general). El fetge, per altra banda, sembla que els distingeix molt bé: capta aminoàcids del plasma i n'allibera als eritròcits, comportament, aquest, que també apareix si s'observa el llit esplàncnic. Pels altres teixits estudiats no es poden extreure conclusions massa evidents degut a que presenten moviments d'aminoàcids quantitativament molt petits.

Obviament, els mecanismes concrets implicats no els

coneixem, però potser aquesta interpretació pugui permetre sortir del cul-de-sac actual en que estroba aquest problema, en haver-hi tantes diferències de resultats en els treballs que s'han realitzat, i contradiccions segons les capacitats de transport observades "in vitro" dels eritròcits.

El que queda clar, amb els resultats obtinguts, és que en la rata no es poden emprar les mesures plasmàtiques com a mesures assimilables al transport total. L'ús del plasma, segons els nostres resultats, no és que infravalori el flux d'aminoàcids, com s'observà en humans (Felig i col., 1973) i en el be (Heitmann i Bergman, 1980), sinó que el distorsiona. Creiem que amb els avenços tècnics que hi ha hagut quant a la mesura d'aminoàcids, no és tant vàlida ja l'excusa que la mesura en sang total comporta un error més alt que la plasmàtica, com se sol, o solia, argumentar (vegeu Heitmann i Bergman, 1980 per exemple), si be, en casos en que s'hagi demostrat un paper poc important dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids, aquell raonament pugui ser vàlid.

V.2. PART 2: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN ERITRÒCITS "IN VITRO"

L'objectiu d'aquesta part ha estat el determinar el transport de diferents aminoàcids en eritròcits de rata, amb la intenció d'establir l'existència, ó no, d'algún tipus de correlació entre els resultats obtinguts "in vivo" de la contribució dels eritròcits al transport inter-òrgans d'aminoàcids i llur capacitat "in vitro" de transport. La manca de bibliografia sobre la presència de diferents sistemes de transport d'aminoàcids en eritròcits de rata i la gran variabilitat d'aquests sistemes segons l'espècie estudiada obliguen a partir de zero pel que respecta a la rata.

V.2.1. Condicions i validesa del mètode emprat en la mesura "in vitro" del transport d'aminoàcids.

Donat que el transport d'aminoàcids pot estar influenciat per la concentració d'aminoàcids dins els eritròcits (fenomens de trans estimulació i de trans inhibició) és convenient realitzar els estudis de transport en eritròcits buits d'aminoàcids, seguint les recomanacions de Lieb i Stein (1974a,b, 1976). Com es pot observar en la figura IV.2.1. la concentració d'aminoàcids dins els eritròcits en els quals mesurem el transport és molt baixa, i en clar acord amb el descrit (Rosenberg, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982). Per altra banda, el manteniment dels nivells d'ATP que observem (fig.IV.2.2.) ens indiquen que els eritròcits no sofreixen alteracions metabòliques importants durant els processos de rentat i d'incubació. Aquests resultats, més el fet ja comentat en Materials i Mètodes (apartat III.2.7.2.) de la total similitut dels valors obtinguts aplicant el nostre mètode en eritròcits humans i els descrits en la bibliografia per aquestes cèl.lules (Young i col.,1983) ens permeten concloure que el nostre

mètode és vàlid per a la mesura del transport "in vitro" d'aminoàcids.

Malgrat que la bibliografia mostri que en els estudis de captació d'aminoàcids per eritròcits no hi ha adsorció en la membrana (Al-Saleh i Wheeler, 1982), hem cregut convenient comprovar-ho en les nostres condicions experimentals. S'ha de tenir en compte que en estudiar la captació en eritròcits per mesures de la radioactivitat d'un lisat cel.lular, d'entrada és impossible discernir entre aquella radioactivitat que es trobava dins la cèl.lula i aquella que estigués enganxada a la membrana cel.lular (adsorció). Trobem que no hi ha diferències entre la presència i l'absència de membrana en el comptatge de radioactivitat, ni tampoc en la presència o absència de Tritó X-100 (taula IV.2.1.). Aquests resultats ens indiquen que no tenim cap fenomen d'adsorció i que per tant tota la radioactivitat mesurada correspon a radioactivitat que es trobava dins la cèl.lula.

V.2.2. Transport d'alanina.

Els nostres resultats mostren que els eritròcits madurs de rata tenen la capacitat d'acumular (overshoot) alanina respecte al medi (fig.IV.2.3.). Aquesta capacitat acumulativa és dependent de Na^+ . L'anàlisi cinètic mostra que el transport d'alanina es pot descomposar en dos components: un petit component dependent de Na^+ i un independent de Na^+ no saturable (fig.IV.2.4.). Aquests resultats contrasten amb els obtinguts per Wise (1975) també en rata, qui observa que els eritròcits només capten aminoàcids per sistemes independents de Na^+ i no presenten capacitat acumulativa. L'origen de les discrepàncies pot residir en que el component dependent de Na^+ que nosaltres trobem és molt petit comparat amb el transport total

d'alanina, sobretot a concentracions altes, a les quals predomina el component independent de Na^+ (fig.IV.2.4.). El treball de Wise està realitzat amb una concentració d'alanina en el medi de 1mM. A aquesta concentració nosaltres trobem que el transport d'alanina mitjançant el component dependent de Na^+ és la meitat del transport mitjançat pel component independent de Na^+ . Pot ser, doncs, que en fer un "overshoot" amb una concentració d'alanina molt per sobre de la K_m (0.25 mM) el transport dependent de Na^+ quedi emmascarat per l'independent de Na^+ , és a dir que hi hauria poca sensibilitat per a discernir-lo. Per altra banda, les dades cinètiques obtingudes ens poden explicar la relativament petita capacitat d'acumul d'alanina que observem respecte al medi (relació in/out:1.35 a les 2 hores) ja que la presència d'un gran component linial i independent de sodi, que es pot assimilar a difusió, pot actuar facilitant la sortida de l'alanina captada amb el sistema dependent de Na^+ (Al-Saleh i Wheeler, 1982).

En eritròcits madurs només s'havia descrit la presència de dependència al sodi en la captació d'alanina en humans (Young i col., 1980, 1983; Rosenberg, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982), i en colom (Vidaver i col., 1964; Eavenson i Christensen, 1967; Wheeler i Christensen, 1967; Wheeler, 1982); mentre que s'ha descrit que no existeix en conill (Winter i Christensen, 1965; Wheeler i Christensen, 1967; Antonioli i Christensen, 1969), ni en ovella (Young i col., 1976; Young i Ellory, 1977; Young i col., 1980) ni en cavall (Fincham i col., 1985; Fincham i Young, 1985)

L'eritròcit de rata sembla ésser més permeable a l'alanina que l'eritròcit humà tal com indica la velocitat de transport que hem obtingut en rata tant pel que fa al component dependent de Na^+ -entre 5 i 10 vegades més ràpid- com al independent -essent el valor de la K_d quasi 50

vegades més alt -en comparar-los amb els descrits per eritròcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col., 1983). No obstant aquesta més alta capacitat de transport, el transport dependent de sodi presenta una constant d'afinitat ($K_m: 0.25 \text{ mM}$) perfectament equiparable a la descrita en eritròcits humans (entre 0.19 i 0.4 mM) (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col., 1983). Podem dir, doncs, que la principal diferència entre el transport d'alanina entre els eritròcits humans i els de rata és el valor de velocitat màxima del sistema dependent de sodi, molt més alt en rata que en humans. Per altra banda, quan el component dependent de sodi el representem segons Eadie-Hoffstee comprovem que de fet existeixen dos components, un de baixa afinitat i alta capacitat, i un d'alta afinitat i baixa capacitat (fig.IV.2.5.). Aquest resultat contrasta amb un únic component dependent de sodi trobat en eritròcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col., 1983).

Els principals sistemes dependents de sodi que transporten alanina descrits per altres tipus cel.lulars són el sistema A i l'ASC (per a revisions vegeu per exemple Kilberg, 1982; Shotwell i col., 1983). En eritròcits, i de fet en tota la línia cel.lular de la que deriven: des d'eritroblasts fins a l'eritròcit madur, no s'ha trobat cap evidència de l'existència del sistema A, i per tant es considera que el sistema ASC és l'únic sistema present en aquestes cèl.lules dependent de sodi que transporta alanina (Wise, 1975; Rosenberg, 1982; Wheeler, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982; Young i col., 1983).

El primer que cal fer quan es vol descriure la presència d'un sistema de transport determinat, és definir els substrats que poden ser transportats per aquest sistema. Per a aconseguir-ho es fan estudis de la inhibició que

produeix la presència d'aquests substrats en el medi en el transport de l'aminoàcid determinat. Això es basa en la consideració de que dos substrats que siguin transportats pel mateix sistema de transport competiran per ell, i per tant, quan un d'ells estigui en una concentració prou alta inhibirà el transport de l'altre. Evidentment, però, una inhibició observada d'aquesta manera no implica necessàriament que es tracti d'una inhibició competitiva, sinó que pot ser deguda a altres causes com interaccions amb el transportador per exemple.

Els nostres estudis d'inhibicions (taula IV.2.2.) ens mostren que el sistema de transport d'alanina dependent de sodi és estereoespecífic ja que la D-alanina és bastant pitjor inhibidor que la L-alanina. També requereix grups amino, com s'observa per la nul·la inhibició produïda per la β -alanina. Per altra banda, les inhibicions que observem ens mostren que aquest sistema no és específic de l'alanina ja que nombrosos aminoàcids tenen un clar efecte inhibidor del transport d'alanina. Entre aquests aminoàcids pot sorprendre les inhibicions produïdes per substrats típicament transportats en altres tipus cel·lulars per sistemes no dependents de sodi (sistema L principalment) com la L-leucina. En aquest sentit cal dir que estudis realitzats en eritròcits humans també han mostrat aquestes inhibicions, però s'ha demostrat que no són inhibicions competitives, és a dir, que aquests aminoàcids no són transportats per aquest sistema de transport (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982; Young i col., 1983). Finalment, i com a dada potser més destacable, el sistema de transport que estem estudiant no accepta grups metil com ens demostra la nul·la inhibició produïda pel metil-aminoisobutirat (Me-AIB). Aquesta darrera dada ens permet afirmar que en eritròcits madurs de rata no existeix el sistema de transport A en ser la capacitat del sistema A per

a transportar el Me-AIB la característica principal que el diferencia d'altres sistemes dependents de sodi.

Totes aquestes dades ens porten a suposar l'existència del sistema de transport ASC en eritròcits madurs de rata tal i com ja estava descrit anteriorment per eritròcits madurs humans i de colom.

V.2.3. Transport de glicina.

Els eritròcits madurs de rata poden acumular glicina (overshoot) respecte al medi (relació in/out:1.7 a les dues hores) sempre i quan el medi contingui Na^+ (fig.IV.2.6.). L'anàlisi cinètic ens mostra que el transport de glicina es pot descomposar en un component linial no dependent de sodi i un component saturable dependent de sodi (fig.IV.2.7.). L'existència d'un transport de glicina dependent de sodi en eritròcits madurs sembla que sempre acompanya a l'existència del sistema ASC, havent estat descrit, doncs, en les mateixes espècies que aquest darrer. Així, s'ha descrit un transport pdependent de sodi en eritròcits madurs de colom (Vidaver, 1964a,b,c; Vidaver i col., 1964; Eavenson i Christensen, 1967; Wheeler i Christensen, 1967; Lee i col., 1973; Wheeler, 1982) i en humans (Young i col., 1980; Ellory i col., 1981; Al-Saleh i Wheeler, 1982), mentre que no existeix en cap altra espècie estudiada com el be (Young i col., 1976;, Young i Ellory, 1977; Young i col., 1980) i el cobaia (Fincham i col., 1984).

Malgrat que el transport dependent de sodi per glicina i alanina es trobin sempre junts no vol dir en absolut que els dos aminoàcids siguin transportats pel mateix sistema de transport. Des dels primers treballs de Vidaver en eritròcits de colom (1964a,b,c) va quedar clar que la glicina és transportada per un sistema d'alta afinitat i

específic per glicina i sarcosina (sistema Gly) diferent del sistema ASC. L'estudi d'inhibicions mostra que l'alanina no inhibeix en absolut al transport dependent de sodi de glicina, mentre que la sarcosina l'inhibeix pràcticament del tot. Per altra banda, el sistema Gly requereix no només el Na^+ sinó que també és dependent del Cl^- (Vidaver, 1964a,b,c; Vidaver i col., 1964; Ellory i col., 1981). Aquesta sembla ésser també la situació en eritròcits madurs de rata, ja que observem que quan es substitueix el Cl^- per ió acetat ó format el transport de glicina dependent de sodi és més baix (taula IV.2.4.).

Totes aquestes dades ens permeten concloure l'existència del sistema Gly en eritròcits madurs de rata. L'anàlisi d'Eadie-Hoffstee d'aquest sistema de transport (fig.IV.2.8.) revela que existeixen de fet dos components: una d'alta afinitat i baixa capacitat i una de baixa afinitat i alta capacitat. Aquest tipus d'anàlisi no permet saber si aquestes dues components són sistemes de transport diferents ó es tracta d'un mateix sistema amb diferents estats, però la possibilitat de que el component de baixa afinitat correpongués en realitat al sistema ASC no la podem deixar de banda, ja que la Km de 0.4 mM obtinguda està en el marge de les Km dels aminoàcids transportats pel sistema ASC i, a més a més, hem vist que quan la concentració de glicina és alta pot inhibir el transport d'alanina dependent de sodi (taula IV.2.2.) senyal de que la glicina, quan la concentració satura al sistema Gly, pot ser transportada també pel sistema ASC. La descomposició en dos components del sistema Gly ha estat descrita en reticulòcits de conill (Winter i Christensen, 1965) i se li ha donat aquesta interpretació (Fincham i col., 1984).

V.2.4. Transport de leucina.

La captació de leucina en eritròcits madurs de rata és un procés enormement ràpid tal com indiquen els resultats obtinguts en mesurar la relació in/out en funció del temps a 37 C (gràfica IV.2.9). Pràcticament, a partir de 30 segons d'incubació s'assoleix una relació in/out quasi de 1 i que apenes es modifica en 120 minuts. Aquests mateixos resultats ens indiquen que el transport de leucina en eritròcits de rata no és un procés dependent de sodi ni presenta la capacitat d'acumular aquest aminoàcid respecte al medi. Aquestes dades estan d'acord amb les dades descrites del transport de leucina mitjançant el sistema L en eritròcits humans (Rosenberg, 1981, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982). Podem observar que, a 37 C, és pràcticament impossible aconseguir linealitat de la captació de leucina en funció del temps i per tant, no podem tenir una mesura precisa de velocitat inicial, ja que un temps inferior a 30 segons seria irreal tenint en compte el protocol d'aturada del transport i del rentat dels eritròcits. Ha estat descrit que el transport de leucina és molt dependent de la temperatura tant en hepatòcits (Le Cam i Freychet, 1977) com en eritròcits humans (Rosenberg, 1981, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982). Aquests últims autors, en eritròcits humans, solucionen aquest problema enlentint el transport de leucina disminuint la temperatura d'incubació a 25 C. D'aquesta manera, malgrat que no s'acabi d'assolir una linealitat com les que veiem per l'alanina i per la glicina, poden treballar amb un temps d'incubació de 30 segons amb una certa linealitat del transport. Nosaltres hem seguit aquesta estratègia fent una mesura de la captació de leucina en funció del temps a 20 C (gràfica IV.2.10), però no observem apenes diferències respecte a la incubació a 37 C. Segurament, aquest resultat ens indica que el transport de leucina en eritròcits de rata és molt més ràpid que en

humans, i que per tant, la disminució de temperatura a 20 C no enlenteix suficientment el transport. No obstant això, hem cregut convenient realitzar totes les mesures de captació de leucina posteriors a 20 C i al mínim temps real d'incubació, que hem calculat que era de 30 segons.

El transport de leucina en eritròcits de rata segueix una cinètica michaeliana sense haver trobat indicis de l'existència de cap component linial (gràfica IV.2.11). A més a més, l'anàlisi per Eadie-Hoffstee de la cinètica del transport de leucina no ens permet suposar l'existència de més d'un component (gràfica IV.2.12), si bé, el fet d'obtenir una única recta no demostra que sigui realment un únic component. Aquesta dada és en desacord amb els resultats obtinguts en uns primers treballs realitzats en eritròcits humans (Winter i Christensen, 1964), però dades molt més recents han demostrat que el segon component trobat per Winter i Christensen (1964) era, possiblement, un artefacte de la mesura i que en realitat només s'observa un únic component en la captació de leucina per eritròcits humans (Young i col., 1980; Rosenberg, 1981, 1982; Al-Saleh i Wheeler, 1982), tal i com observem nosaltres en eritròcits de rata. De fet, la diferència més important entre les nostres dades de la cinètica de leucina en eritròcits de rata i les dades bibliogràfiques d'eritròcits humans està en la velocitat màxima d'aquest transport, essent entre 5 i 10 vegades més alta en eritròcits de rata que en humans, la qual cosa concorda amb el que havíem comentat anteriorment en observar la manca d'efecte enlentidor de la captació en disminuir la temperatura d'incubació. La K_m , per altra banda, és pràcticament idèntica a la descrita en eritròcits humans pels autors abans esmentats.

En estudiar les capacitats inhibidores de diferents aminoàcids sobre el transport de L-leucina en eritròcits de

rata (taula IV.2.5) observem que el patró obtingut d'inhibicions és sensiblement diferent al descrit per eritròcits humans. Podem veure que el transport de L-leucina és estereoselectiu ja que la D-leucina a una concentració de 10 mM no és capaç d'inhibir la captació de L-leucina, i per tant és capaç de distingir entre aquests dos estereoisòmers. La característica estereoselectiva del transportador de leucina ha estat descrita d'una forma molt clara en eritròcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982) on s'ha observat que les inhibicions produïdes pels isòmers D són quantitativament molt menors que les produïdes pels isòmers L. Pel que fa a les inhibicions produïdes per altres aminoàcids, observem que, contràriament al descrit en eritròcits humans, els aminoàcids que generalment són transportats pel mateix sistema que la leucina i que per tant haurien de donar les més grans inhibicions, com serien la valina, la isoleucina, la fenilalanina i la metionina, no són capaços d'inhibir el transport de leucina, o si ho fan és en un tant per cent molt baix. Contràriament, aminoàcids que en eritròcits humans no produeixen inhibició detectable del transport de leucina com β -alanina, histidina, D-alanina, serina, treonina i arginina, en eritròcits de rata són capaços d'inhibir el transport de leucina.

Si haguèssim de fer cas exclusivament d'aquestes dades d'inhibicions per a caracteritzar el sistema de transport de la leucina, podriem dir que es tracta d'un sistema estereoselectiu, que es un sistema que pot transportar aminoàcids neutres de cadena curta (amb les excepcions de la glicina i de l'alanina), que reconeix els aminoàcids bàsics (amb l'excepció de la lisina), que pot acceptar grups metil (com ens indica el fet de que tant l'AIB com el MeAIB tenen pràcticament la mateixa capacitat d'inhibir el transport de leucina) i que reconeix també grups β -amino (com ens indica el significatiu grau d'inhibició que

assoleix la β -alanina). En canvi, aquest sistema de transport no reconeix aminoàcids neutres de cadena llarga ó ramificada, amb l'excepció de la leucina, ni aminoàcids de caràcter àcid. S'ha d'anar en compte, però, a l'hora d'interpretar les dades d'inhibicions realitzades a una única concentració. D'entrada no sabem si les inhibicions que observem són competitives ó no, és a dir, si realment l'aminoàcid que inhibeix el transport de leucina és transportat pel mateix sistema. En aquest sentit, s'ha descrit en eritròcits humans que les inhibicions observades del transport d'aminoàcids neutres de cadena curta per aminoàcids de cadena ramificada ó la fenilalanina són de tipus mixte amb una gran proporció d'inhibició no competitiva (Rosenberg, 1982), és a dir que es tracta d'una inhibició produïda per interaccions aminoàcid-transportador sense que hi hagi un transport de l' aminoàcid inhibidor en qüestió. Una altra qüestió a tenir en compte és la idoneïtat de la concentració d'aminoàcid inhibidor escollida. Hem de pensar que el transport de leucina es satura, segons les nostres dades, a altes concentracions d'aquest aminoàcid. Pot succeir que la concentració dels aminoàcids testats (10 mM) sigui massa baixa per a que tinguin un efecte inhibidor observable, i més si tenim en compte que l'afinitat del transportador de leucina per aminoàcids com L-valina ó L-isoleucina pot ser més baixa que per la leucina, com de fet ha estat descrit en eritròcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982), i que la concentració de leucina amb la que s'ha realitzat els estudis d'inhibició és 1000 vegades més baixa que la de l'aminoàcid inhibidor (10 μ M en front a 10 mM) essent una concentració enormement allunyada de la saturació. Dit en altres paraules, suposant que aminoàcids tipus L-valina ó L-isoleucina siguin en realitat transportats pel mateix sistema de transport que la L-leucina, no seria necessari que el seu transport es saturés a 10 mM de concentració ni de bon troç, i per tant, el fet

de no observar cap inhibició en les concentracions testades no es pot considerar com una prova de que els sistemes de transport de leucina per una banda i el de valina per l'altra siguin diferents.

Tenint en compte, doncs, els resultats obtinguts i les consideracions que hem fet de la seva interpretació, així com les característiques descrites del sistema L, creiem que no tenim motius per a suposar l'existència d'un sistema de transport diferent d'aquest i que per tant hem de pensar que en eritròcits madurs de rata existeix un sistema de transport no dependent de sodi que per les seves característiques el podem assimilar al sistema L descrit en eritròcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Rosenberg, 1982).

V.2.5. Transport de glutamina.

Les dades obtingudes mostren que els eritròcits madurs de rata poden acumular L-glutamina respecte al medi, arribant a una relació IN/OUT propera a 1.5 a les dues hores d'incubació i que aquesta capacitat acumulativa no és dependent de la presència de sodi en el medi (gràfica IV.2.13). No obstant aquesta certa capacitat acumulativa l'anàlisi cinètic del transport de L-glutamina ens mostra que el procés és linial sense cap indicatiu de saturació, al menys en el marge de concentracions mesurades (gràfica IV.2.14). La linialitat del transport en funció de la concentració ens indica que o bé la glutamina no és captada mitjançant cap sistema de transport, és a dir que ho seria simplement per un procés de difusió, o bé que essent transportada per un sistema de transport l'afinitat d'aquest sistema per la glutamina és molt baixa mentre que la capacitat d'aquest transport és molt alta, de forma que la

linialitat només fóra aparent i a molt més altes concentracions es podria detectar una saturació (suposant que aquestes altes concentracions no afectessin la cèl.lula per problemes d'osmolaritat).

La glutamina és un aminoàcid neutre que és transportat per diferents sistemes de transport segons el tipus cel.lular estudiat i que, com succeix amb molts altres aminoàcids, en una mateixa cèl.lula el seu transport total pot ser la suma de diferents sistemes de transport. S'ha descrit que en les cèl.lules d'Ehrlich el transport de glutamina és mitjançat pels sistemes L, A i ASC (Oxender i Christensen, 1963; Koser i Christensen, 1971) i pels sistemes L i ASC en cèl.lules dels illots pancreàtics (Prentki i Renold, 1983). S'ha descrit també un sistema molt específic per aquest aminoàcid, junt amb l'asparagina i la histidina, dependent de sodi i anomenat sistema N únicament, per ara, en hepatòcits i en cèl.lules d'hepatomes (Kilberg i col., 1980; Kilberg, 1982; Fafournoux i col., 1983) i molt recentment sembla que hi ha evidències de l'existència d'aquest sistema N en cèl.lules leucèmiques de la sèrie P388 (Lazarus i Panasci, 1986). En eritròcits, però, el transport de L-glutamina ha estat molt poc estudiat, havent estat descrit que en eritròcits de colom aquest aminoàcid seria transportat pel sistema ASC (Koser i Christensen, 1971).

Els resultats que hem obtingut ens fan pensar que, malgrat no haver trobat saturació del transport de glutamina en les concentracions testades, el transport de glutamina en eritròcits madurs de rata seria mitjançat per un, ó més d'un, sistema(es) de transport encara que amb una afinitat molt baixa ja que es difícil imaginar un procés de difusió simple, és a dir que depengui únicament del gradient de concentració a dins i a fora de la cèl.lula, que resulti en una relació de concentracions dins/fora més gran de 1 i per

tant que es realitzi contra gradient. Es molt difícil poder arribar a dir quins podrien ser aquest(s) sistema(es) ja que per una banda hem comprovat que la glutamina a altes concentracions (10 mM) pot inhibir el transport dependent de sodi d'alanina (taula IV.2.2), però en canvi no observem que el transport de glutamina sigui dependent de sodi, la qual cosa sembla descartar el sistema ASC (encara que si el component és molt petit comparat amb el transport total no l'arribariem a detectar). També hi ha la possibilitat de que es tracti del sistema L encara que no observem inhibició per part de la glutamina del transport de leucina (taula IV.2.5) (la qual cosa com ja hem comentat anteriorment, apartat V.2.4, no demostra que no ho sigui).

Hem de fer notar que en hepatòcits de rata s'observa que el transport de L-glutamina en absència de sodi (per tant no es tracta del sistema N) té la capacitat d'acumular aquest aminoàcid respecte el medi, arribant als 20 minuts d'incubació a una relació de concentracions dins/fora de 1.6 (Fafournoux i col, 1983) que és molt semblant a la que trobem nosaltres (propera a 1.5). Es possible, doncs, que es tracti del mateix tipus de fenomen. Una possible explicació seria que el transport de glutamina pogués funcionar per bescanvi amb aminoàcids de dins la cèl.lula, de forma que no hi hauria un guany net d'aminoàcids sinó simplement una substitució. Dit d'una altra forma, la cèl.lula pot concentrar un aminoàcid a costa de la pèrdua d'un altre. Aquesta capacitat de bescanvi és típica del sistema L tal i com s'ha descrit en tots els tipus cel.lulars on s'ha estudiat (per revisió vegeu per exemple Guidotti i col., 1978; Kilberg, 1982; Vadgama i Christensen, 1985; Christensen, 1985) amb la curiosa excepció dels reticulòcits de conill (Winter i Christensen, 1965) i dels eritròcits de colom (Wheeler i Christensen, 1967a).

V.2.6. Transport de prolina.

Els estudis de captació de prolina per eritròcits madurs de rata (gràfica IV.2.15) mostren la gran permeabilitat de la membrana eritrocitària per aquest iminoàcid, i també la capacitat d'acumul a temps molt més curts que els que veiem pels altres aminoàcids estudiats, la qual cosa encara és més sorprenent si pensem en la manca total de dependència al sodi que presenta la captació de prolina. Els estudis de la cinètica del transport de prolina (gràfica IV.2.16) ens mostren que aquesta cinètica és perfectament linial en el marge de concentracions estudiats, quedant ben patent la gran permeabilitat abans esmentada en considerar que la capacitat de la captació de prolina és del mateix ordre que la de la leucina (compareu les dades de les gràfiques IV.2.11 i IV.2.16), -sense haver obtingut, però, indicis de que aquesta captació de la prolina sigui mitjançada per algun sistema de transport en ser una cinètica no saturable- i unes 10 vegades més alta que la de la glutamina (gràfica IV.2.14), 50 vegades més gran que la del transport total d'alanina (gràfica IV.2.4) i unes 100 vegades més alta que el transport total de glicina (gràfica IV.2.7).

La prolina és un iminoàcid del que es coneix ben poc les rutes de transport en diferents cèl.lules. Apart de les membranes del "brush border" intestinal on s'ha descrit un sistema de transport dependent de sodi per iminoàcids (vegeu apartat I.1.1.1) (Stevens i col., 1984; Munck, 1985a,b) es creu que la prolina és transportada pel sistema ASC almenys en cèl.lules hepàtiques, conclusió a la que s'ha arribat amb estudis d'inhibicions més que no pas estudiant directament la cinètica del transport d'aquest iminoàcid (Christensen i col., 1967; Kilberg i col., 1981; Christensen, 1984). Nosaltres havíem vist que la L-prolina inhibia

significativament el transport dependent de sodi de l'alanina (vegeu taula IV.2.2), la qual cosa podria estar d'acord amb un transport de prolina mitjançat pel sistema ASC. El transport que observem de prolina, però, no és dependent de sodi, fet que descarta que la prolina sigui transportada per aquest sistema, almenys de forma detectable. Creiem, doncs, que ens trobem en un cas molt similar, sinó el mateix, al del transport de glutamina, i en gran part podem fer extensiu el que comentàvem en l'apartat anterior al cas present de la prolina, ja que en ambdós casos tenim transports no dependents de sodi amb cinètiques no saturables però amb capacitats acumulatives d'aquests aminoàcids (iminoàcid el cas de la prolina) respecte la seva concentració en el medi. Que la prolina pugui ser trans-estimulada, és a dir que pugui bescanviar-se amb algun altre aminoàcid podria ésser una explicació dels resultats obtinguts, però no hem trobat cap referència que ens permeti justificar-ho.

V.2.7. Transport de lisina.

Els estudis de captació de L-lisina per eritròcits de rata ens mostren que la concentració d'aquest aminoàcid dins la cèl.lula s'equilibra a les dues hores d'incubació assolint una relació de concentracions dins i fora la cèl.lula de 1 (gràfica IV.2.17). A més a més, observem que la captació de L-lisina no depèn de la presència de sodi en el medi. La captació, aximateix, mostra ser linial amb el temps en els primers 2 minuts d'incubació. L'estudi de la velocitat de transport en funció de la concentració de L-lisina (gràfica IV.2.18) ens mostra una cinètica linial, sense indicis de saturació en el marge de concentracions testades, que malgrat que en la gràfica estigui representat només fins a 2 mM, vàrem comprovar que la linialitat existia fins a 40 mM. El motiu de representar en la gràfica les

concentracions baixes ha estat el fet de que s'ha descrit en eritròcits humans un sistema de transport per aminoàcids bàsics no dependent de sodi, el sistema Ly^+ , que presenta una K_m per la L-lisina del voltant de 80 μM (Young i col., 1980), tractant-se per tant d'un sistema d'alta afinitat. Aquest component d'alta afinitat va acompanyat d'un component linial d'alta capacitat amb una K_d aparent d'aproximadament 0.07 min^{-1} . Si en eritròcits de rata existís un sistema de transport del tipus Ly^+ hauria de manifestar-se precisament a baixes concentracions. La total linialitat obtinguda ens fa pensar que l'eritròcit de rata no presenta el sistema Ly^+ . Continuant la comparació amb les dades d'eritròcits humans, els nostres resultats indiquen que, com en tots els altres aminoàcids testats, la permeabilitat als aminoàcids de la membrana dels eritròcits de rata és més alta que la dels eritròcits humans, com mostra el fet de que la K_d que nosaltres hem obtingut és d'unes 2-3 vegades més alta que la descrita per eritròcits humans (Young i col., 1980).

V.2.8. Transport de glutamat.

La captació de L-glutamat per eritròcits de rata és realment molt baixa, fins el punt de que al cap de dues hores la relació de concentració dins i fora de la cèl.lula tot just supera el 0.1 (gràfica IV.2.19). Per altra banda, sembla ser un procés no dependent de sodi. L'estudi del transport del L-glutamat en funció de la concentració ens mostra una cinètica linial, en el marge de concentracions testades, sense cap indicatiu de saturació (gràfica IV.2.20), i amb una constant de difusió, K_d , força baixa si la comparem amb la d'altres aminoàcids que presenten també cinètiques linials com prolina i lisina, però del mateix ordre, o fins i tot més alta, que les obtingudes pels components linials del transport de glicina i d'alanina.

El glutamat és un aminoàcid àcid que ha estat repetidament catalogat com a impermeable a la membrana dels eritròcits. En aquest sentit destaquen les dades obtingudes en eritròcits humans i de be (Winter i Christensen, 1964; Young i col., 1980 entre altres) on la captació d'aquest aminoàcid és pràcticament indetectable, fet que ha comportat no poca polèmica donada l'alta concentració d'aquest aminoàcid en eritròcits trobada "in vivo". Les nostres dades estan clàrament en aquest sentit de la baixa permeabilitat per aquest aminoàcid de la membrana dels eritròcits de rata però, al igual que succeïa amb els altres aminoàcids estudiats, creiem que aquesta impermeabilitat és menys acusada que en els eritròcits d'altres espècies. Dins d'aquest context d'una baixa i lenta captació de glutamat per eritròcits sobresurt la troballa d'un sistema de transport específic per aminoàcids àcids, glutamat i aspartat, en eritròcits de gos, d'altíssima afinitat com indica una K_m de l'ordre de 11 μM pel glutamat i amb dependència de sodi (Inaba i Maede, 1984), sistema, per altra banda, molt freqüent en altres tipus cel·lulars designat com a sistema X_{AG} (vegeu per a revisió Christensen, 1984), i del que no s'han trobat indicis de la seva presència en els eritròcits de cap altra espècie.

V.3. PART 3: TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN RETICULÒCITS "IN VITRO".

En aquesta part hem intentat establir quines són les característiques del transport de certs aminoàcids en reticulòcits a la llum dels coneixements que hi ha en reticulòcits d'altres espècies, segons els quals aquestes cèl.lules tenen més capacitat per a transportar alguns aminoàcids que els eritròcits. Hem posat a punt una tècnica, basant-nos en la bibliografia, per a obtenir rates amb alts nivells de reticulòcits circulants i hem mesurat el transport, en suspensions cel.lulars riques en reticulòcits, de L-alanina, glicina, L-leucina, L-glutamina i L-glutamat.

V.3.1. Obtenció de reticulòcits.

El mètode d'obtenció de reticulòcits que hem emprat es basa en produir una ràpida baixada dels eritròcits circulants amb la qual cosa s'obliga a l'animal a alliberar a la circulació de forma brusca altes quantitats de reticulòcits. Existeixen de fet dos mètodes, principalment, per aconseguir alts nivells de reticulòcits circulants. El primer és l'administració de fenilhidracina en un parell de dosis, la qual cosa és suficient per a destruir una gran quantitat d'eritròcits, i per tant provocar un gran alliberament de reticulòcits a la circulació en els 2-3 dies posteriors (Winter i Christensen, 1965; Wheeler i Christensen, 1967; Antonioli i Christensen, 1969; Wise, 1975). L'altre mètode és una extracció continuada de suficient quantitat de sang, amb la consegüent pèrdua d'eritròcits, provocant així la sortida de reticulòcits a la circulació (Yunis i Arimura 1965; Benderoff i col., 1978; Tucker i Yoyng 1980, 1982; Fincham i col., 1984). El mètode de la fenilhidracina ha caigut en desús precisament pels seus efectes tòxics a nivell de les membranes poc

recomanable en estudis de transport (Tucker i Young, 1982). Nosaltres hem emprat el segon mètode: extracció de 3 ml de sang durant 3 dies amb la qual cosa s'aconsegueix un pic de reticulòcits del 40% el quart dia després de l'última extracció de sang (gràfica IV.3.1). Desconeixem, però els motius d'obtenir un pic molt més petit i abans quan l'extracció de sang es perllonga durant 4 dies (gràfica IV.3.1).

S'ha descrit que els reticulòcits alliberats d'una forma repentina i en grans quantitats, són més grans, tenen un més gran contingut en hemoglobina i una vida més curta que els antecessors normals dels eritròcits circulants, i fins i tot se'ls amonena "pseudoreticulòcits" (Antonioli i Christensen, 1969). Nosaltres, en mesurar una sèrie de paràmetres hemàtics de sang rica en reticulòcits, hem observat que si que existeix una tendència a ser cèl.lules més voluminoses, però el contingut d'hemoglobina per cèl.lula és similar (taula IV.4.1). Sigui com sigui, aquesta és una forma d'obtenir reticulòcits molt emprada i el fet de tenir, potser, uns reticulòcits no del tot "normals" no la invalida.

V.3.2. Transport d'alanina.

Hem comprovat que el procés de rentat i posterior incubació de la suspensió cel.lular rica en reticulòcits, que anomenarem simplement reticulòcits sense voler dir això que es tracta d'una suspensió pura, no altera el contingut energètic de les cèl.lules mesurada pels nivells d'ATP intracel.lular (gràfica IV.3.2). Aquesta dada, junt al que havíem comentat en l'apartat V.2.1 per eritròcits, ens permet suposar que no hi ha alteracions greus dels reticulòcits que puguin afectar les seves característiques metabòliques normals.

Els primers treballs de transport d'aminoàcids en reticulòcits de conill (Winter i Christensen, 1965; Wheeler i Cristensen, 1967b) demostraren que aquestes cèl.lules tenien la capacitat d'acumular alanina respecte el medi, i que aquesta acumulació era dependent de sodi. Això és el que nosaltres trobem en reticulòcits de rata (gràfica IV.3.3). L'anàlisi cinètica més detallada ens mostra que el transport total d'alanina es pot descomposar en un component linial no dependent de sodi i un component saturable dependent de sodi (gràfica IV.3.4) al igual que el descrit en reticulòcits humans (Young i col., 1983) demostrant, aquests autors, que el sistema de transport d'alanina era el sistema ASC descrit en altres tipus cel.lulars (Christensen i col., 1967; Kilberg i col., 1981). Aquest sistema de transport té la característica de no acceptar grups metil, i per tant el transport d'alanina, si és transportada per aquest sistema, no ha d'ésser inhibit per el Me-AIB. Això és el que trobem nosaltres en reticulòcits de rata (taula IV.3.1). Aquesta dada ens permet a més a més confirmar l'absència del sistema A en les cèl.lules sanguínies (també ho hem comprovat en eritròcits: vegeu apartat V.2.2) aquest cop de rata, tal i com s'havia vist en eritròcits i reticulòcits humans (Al-Saleh i Wheeler, 1982; Young i col., 1983). La suposició de que es tracta del sistema ASC queda recolzada per la inhibició que observem del transport d'alanina per L-serina. També observem inhibició del transport d'alanina per glicina i per L-glutamina. Encara que una inhibició no sigui una prova total, aquestes inhibicions les podem interpretar com que tant un aminoàcid com l'altre, a una concentració suficientment alta, també serien transportats pel sistema ASC.

V.3.3. Transport de glicina.

En els reticulòcits de totes les espècies estudiades

s'ha comprovat que la glicina és transportada pel sistema Gly. Aquestes espècies inclouen el conill, el be, el cobaia, (Winter i Christensen, 1965; Benderoff i col., 1978; Fincham i col., 1984). Aquest sistema es caracteritza per l'especificitat que té per glicina i sarcosina i per la dependència de sodi i de Cl^- . Les nostres dades mostren que els reticulòcits de rata tenen la capacitat d'acumular glicina respecte al medi (gràfica IV.3.6), que aquesta capacitat és dependnet de sodi, i que el transport total de glicina és la suma d'un component linial independent de sodi i un component saturable dependent de sodi (gràfica IV.3.7). Els resultats d'inhibicions mostren clarament la inhibició del transport de glicina dependent de sodi per sarcosina i la manca d'inhibició produïda per L-alanina i Me-AIB (taula IV.3.2). A més a més, hem comprovat que quan es substitueix el Cl^- en el medi per ió acetat ó formiat el transport de glicina dependent de sodi s'inhibeix considerablement (taula IV.3.3) la qual cosa indica una dependència de Cl^- del transport de glicina.

Tots aquests resultats ens permeten concloure que en reticulòcits de rata hi és present el sistema Gly.

V.3.4. Transport de glutamina.

L'única referència que tenim del transport de glutamina en reticulòcits indica que aquest aminoàcid seria transportat pel sistema ASC (Thomas i Chrstensen, 1971 en reticulòcits de conill).

Les nostres dades indiquen que els reticulòcits de rata tenen la capacitat d'acumular glutamina sobretot en presència de sodi, però també de forma clara en la seva absència (gràfica IV.3.9). Per altra banda, el transport total de glutamina és la suma dun component linial

independent de sodi i un component saturable dependent de sodi (gràfica IV.3.10). A més a més, hem comprovat que el transport de glutamina és inhibit per L-alanina i no pel Me-AIB (taula IV.3.3). Fins ací, aquestes dades indicarien que la glutamina seria transportada pel sistema ASC d'acord amb Thomas i Christensen (1971) en reticulòcits de conill.

S'ha demostrat que en fetge existeix un sistema de transport dependent de sodi que presenta especificitat per glutamina, asparagina i histidina (Kilberg i col., 1980; Fafournoux i col., 1983).

La descripció d'un sistema nou és una tasca complexa que requereix moltes proves. El sistema N només ha estat descrit en cèl.lules hepàtiques, com acabem de comentar i en cèl.lules HTC d'hepatomes (Handlogten i col., 1981) i molt recentment en cèl.lules leucèmiques de ratolí (Lazarus i Panasci, 1986). Com podem veure, totes aquestes descripcions, i amb més raó la primera, són posteriors a la referència de reticulòcits.

Les dades que hem obtingut mostren que la histidina inhibeix de forma clara el transport dependent de sodi, encara que en menor grau que L-alanina. Una de les diferències més emprades en la distinció del sistema N d'altres sistemes dependents de sodi que poden transportar glutamina és la resposta del transport en front a canvis de pH. S'ha descrit que tant el sistema A com el sistema N són molt sensibles a pH per sota de 7 i responen ambdós inhibint-se considerablement (Kilberg i col., 1980, Lazarus i Panasci, 1986). Aquesta resposta és diferent a la del sistema ASC el qual és bastant insensible als canvis de pH (Christensen i col., 1967; Kilberg i col., 1981), encara que té respostes més aviat variables. En cèl.lules com les hepàtiques en les que hi ha els 3 sistemes és difícil

arribar a separar-los d'una forma clara per comportament en front el pH. Els reticulòcits tenen l'avantatge important de que no tenen el sistema A (vegeu apartat V.3.2) i per tant pot ser possible discernir entre el sistema ASC i el N jugant amb el pH de la incubació. Això és el que hem fet, mesurant el transport de L-alanina, com a aminoàcid transportat pel sistema ASC, i el transport de glutamina, que si és transportat pel mateix sistema ASC haurà de presentar el mateix comportament que l'alanina en front a canvis de pH. Els resultats obtinguts mostren que el transport de glutamina és molt més sensible a la disminució de pH (gràfica IV.3.12), inhibint-se a pH 6.5 en un 80% mentre que l'alanina només s'inhibeix un 50%. També és prou diferent la resposta obtinguda en augmentar el pH, estimulant-se el transport d'alanina i no variant el de glutamina respecte al transport a pH 7.4.

Aquests resultats ens indiquen, encara que no demostren, que els reticulòcits de rata podrien tenir el sistema N. La qual cosa, representa la primera descripció del sistema N en cèl.lules sanguínies.

V.3.5. Transport de leucina.

El transport de leucina clàssicament es realitza pel sistema L i aquest sembla ser el cas també pels reticulòcits de conill i de be (Winter i Christensen 1965; Wheeler i Christensen, 1967b; Benderoff i col., 1978).

Les nostres dades mostren que els reticulòcits de rata no tenen la capacitat d'acumular leucina ja sigui en presència o en absència de sodi. El transport de leucina no presenta dependència de sodi i és saturable. Els valors obtinguts de $V_{m\grave{a}x}$ i de K_m són similars als descrits en la bibliografia (Wheeler i Christensen, 1967b; Benderoff i

col., 1978). Per tant concluïm que en reticulòcits de rata hi és present el sistema L.

V.3.6. Captació de glutamat.

No tenim referències d'estudis del transport d'aminoàcids aniònics en reticulòcits. Les nostres dades indiquen que la membrana del reticulòcit és molt impermeable al glutamat, com demostra el fet que en 120 minuts d'incubació no s'equilibri i que la màxima relació de concentracions dins i fora la cèl.lula sigui tot just de 0.2 en 120 minuts d'incubació.

V.3.7. El transport d'aminoàcids en funció de la maduració de reticulòcit a eritròcit.

Hem anat comentant al llarg d'aquesta memòria que el reticulòcit, en madurar a eritròcit, perd, pèrdua que pot ser total ó parcial segons l'espècie, alguns sistemes de transport ó certes característiques del transport d'alguns aminoàcids. Aquestes pèrdues sempre fan referència als transports que són dependents de sodi, mentre que els independents de sodi solen romandre igual en la maduració (Winter i Christensen, 1965; Wheeler i Christensen, 1967b; Christensen i Antonioli, 1969; Antonioli i Christensen, 1969; Wise, 1975; Young i col., 1983; Fincham i col., 1984).

Les dades que hem obtingut estan en aquest sentit: La maduració de reticulòcit a eritròcit comporta una disminució de la $V_{m\grave{a}x}$ del transport d'alanina i un augment de la K_m , no obstant això, la pèrdua del sistema ASC no és total, havent-se trobat també en eritròcits madurs. El mateix trobem pel que respecte al transport de glicina i a la presència del sistema Gly, el qual roman, encara que amb menor capacitat en eritròcits madurs.

Trobem per altra banda que el transport de leucina no pateix gaires canvis en el procés de la maduració. Aquestes dades ens permeten concloure que la rata és més semblant als humans que al conill ó al cobaia i i molt menys al be.

El transport de glutamina, però, sí que es perd totalment en la maduració del reticulòcit de forma que passem d'una cèl.lula que presenta un sistema de transport molt afí per la glutamina (possiblement el sistema N) a una cèl.lula, l'eritròcit, on el transport de glutamina no és saturable, indicant, però no demostrant, aquest fet que no seria transportada per cap sistema de transport.

Es precisament aquesta gran variació en el transport de glutamina en l'eritròcit respecte al reticulòcit la que ens ha permès considerar que la contaminació per reticulòcits que hi hagués en les suspensions del que nosaltres hem anomenat eritròcits madurs no tenien cap efecte en la mesura del transport. Es a dir que ens permet concloure que els baixos transports dependents de sodi que hem trobat en eritròcits no eren deguts a la presència d'un petit nombre (aproximadament un 2%, vegeu taula IV.1.1) de reticulòcits amb uns transports dependents de sodi molt alts.

Ja hem comentat en la introducció d'aquesta memòria (vegeu apartat I.3) que els motius d'aquesta pèrdua, total ó parcial, de sistemes de transport ó capacitats de transport, lligades a la dependència al sodi no estaven clars. No s'ha pogut trobar cap connexió entre activitats metabòliques diferencials entre un tipus de cèl.lula i l'altre que els puguin explicar: pèrdua de la capacitat respiratòria, pèrdua de la capacitat de síntesi de proteïnes, amb nivells d'ATP intracel.lulars que són més baixos en eritròcits que en reticulòcits (compareu les gràfiques IV.2.2 i IV.3.2). Una possible explicació, no demostrada, fora que aquesta pèrdua

estigués associada a la capacitat de síntesi de proteïnes però d'una forma indirecta, i dependria de la vida mitjana dels transportadors. Podria ésser que aquesta vida mitjana fos més alta pels sistemes independents de sodi que pels dependents de sodi, de forma que aquests darrers desapareixerien primer. Això podria ser també una explicació al fet de trobar que la maduració a eritròcit comporta l'aparició d'un segon component, no caracteritzat, en el transport d'alanina i de glicina, el qual es podria interpretar com un estat degradatiu diferent del mateix sistema, amb diferent afinitat per l'aminoàcid.

V.4. PART 4: CONTRIBUCIÓ DELS "RETICULÒCITS" AL TRANSPORT "IN VIVO D'AMINOÀCIDS ENTRE ELS ÒRGANS.

V.4.1. Estat dels animals.

Hem comentat en l'apartat V.3.1 el mètode d'obtenció d'alts nivells de reticulòcits circulants que consisteix en una extracció important de sang i la posterior recuperació, parcial però. Els paràmetres hemàtics que hem mesurat (taula IV.4.1) ens indiquen que els animals, quan presenten el màxim de reticulòcits circulants, no han recuperat del tot l'hematòcrit. Sembla que aquesta és la principal diferència respecte a les rates normals, apart de les directament relacionades amb els alts nivells de reticulòcits circulants i el baix hematòcrit. Tant pel que fa a pH, pO_2 i pCO_2 com els fluxos sanguinis no observem que siguin diferents i per tant aquests paràmetres no semblen estar afectats per l'hematòcrit baix ni pels nivells més elevats de reticulòcits en la circulació. No tenim referències de que s'hagin realitzat mesures d'aquest tipus en rates, o altres animals, en condicions de reticulòcits circulants elevats, o en situacions que impliquin una disminució de l'hematòcrit, que no deixa de ser una situació d'anèmia.

V.4.2. Compartimentació sanguinària d'aminoàcids i relació de concentracions cèl.lules/plasma.

La concentració d'aminoàcids en la sang arterial en la situació d'alts nivells de reticulòcits circulants és bastant similar a una situació normal (compareu les taules IV.4.4 i IV.1.4). Potser les diferències més importants són per una banda la concentració més alta d'aspartat i de glicina i per l'altra, una disminució de la concentració dels aminoàcids ramificats. De fet tots els aminoàcids essencials disminueixen d'una forma més o menys clara amb

l'excepció de la treonina, metionina i triptofan. Obviament, ens és impossible conèixer els motius de les diferències que acabem de comentar i tampoc tenim bibliografia que ens pugui orientar. S'ha de tenir en compte que el mètode d'obtenció de reticulòcits és molt traumàtic i és possible que això tingui efectes a molts nivells, com per exemple una disminució en la ingesta d'aliment que produexi aquesta disminució d'aminoàcids essencials (encara que no tots). També pot ser que el que hi hagi una activa reticulocitosis impliqui unes necessitats més grans d'aminoàcids per a la síntesi de proteïnes.

Estudiant la compartimentació sanguínia d'aminoàcids queda patent que els canvis que acabem de comentar de concentració en sang total corresponen a canvis de la fracció corpuscular de la sang mentre que la plasmàtica varia relativament poc, i això és vàlid tant en els casos d'increment de concentració com en els de disminució. Un valor de l'hematòcrit més baix jugaria a favor d'una disminució de la concentració en la fracció corpuscular de la sang, sempre hi quant no variés la concentració dins de les cèl.lules. Això es veu millor fent la relació de concentracions (corregides pel contingut d'aigua) en les cèl.lules i el plasma (taula IV.4.5) observant-se que són en realitat canvis en la concentració en les cèl.lules els responsables principals de les variacions en la concentració sanguínia d'aminoàcids. És interessant que els canvis que observem d'aquesta relació de concentracions E/P estiguin relacionats, no podem dir que hi hagi una relació causa-efecte, amb el transport d'aminoàcids que hem mesurat "in vitro". Recordant els valors que hem obtingut veiem que en reticulòcits l'alanina, la glutamina i la glicina presentaven un transport més alt (increment de $V_{m\grave{a}x}$ i disminució de la K_m) que en eritròcits. Si mirem la relació E/P obtinguda "in vivo" veiem que per aquests 3 aminoàcids

està incrementada. Pel cas de la leucina havíem vist, encara que en el seu moment no li havíem donat massa importància, que la relació "in vitro" en funció del temps era més baixa en reticulòcits que en eritròcits així com la $V_{m\grave{a}x}$ de transport. "In vivo" observem que la relació E/P per la leucina és també més baixa en eritròcits que en reticulòcits. Sembla, doncs, que la concentració relativa d'aminoàcids en eritròcits (ó reticulòcits) té alguna relació amb el transport determinat "in vitro", però no per tots els aminoàcids sobretot els aminoàcids àcids.

V.4.3. Balanç intestinal d'aminoàcids.

Les rates amb alts nivells de reticulòcits circulants tenen un balanç d'aminoàcids intestinal no massa representatiu d'una situació absortiva. Hi ha poc alliberament d'aminoàcids a la circulació (gràfica IV.4.1). El que més destaca és la manca de captació que observem de glutamina i la quantitativament gran sortida d'alanina i glicina. Tenint en compte la importància de la glutamina com a substrat enenergètic per l'intestí (Windmueller i Spaeth, 1974, 1980) descrit tant en condicions d'alimentació com de dejuni, la manca de captació en el nostre cas el podem interpretar com que en les nostres condicions la glutamina no és un substrat tant important, potser per que n'hi hagi una altre més disponible com cossos cetònics per exemple, ó bé que la glutamina provinent de la dieta és una quantitat suficient per l'intestí, com sembla que seria el cas de dietes hiperproteiques i/ó concentrades en el temps (Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col, 1978). No hem mesurat la quantitat de menjar que ingereixen les rates en aquesta situació, ni el ritme de la ingesta. Es doncs possible que no es trobin en una situació absortiva, ó siguin animals que, degut a l'extracció d'una quantitat considerable de sang -uns 9 ml en 3 dies- es trobin en una espècie de

situació de malnutrició.

Pel que respecte a la contribució que fan les cèl.lules sangínies, que anomenarem simplement reticulòcits, al balanç intestinal d'aminoàcids, poques conclusions es poden treure degut a que per la majoria d'aminoàcids el flux és molt petit, però resalta el fet que l'intestí capti aminoàcids de la fracció plasmàtica de la sang i n'alliberi a la fracció corpuscular. Sembla, doncs, que a diferència del que veiem en rates normals, l'intestí de les rates amb alts nivells de reticulòcits circulants distingeixen entre ambdues fraccions sanguínies. Es a dir que en aquest cas el paper de les cèl.lules seria en termes generals contrari al del plasma, però amb uns papers invertits segons les dades d'Elwyn en gos (Elwyn i col., 1968).

V.4.4. Balanç hepàtic d'aminoàcids.

El fetge de rates amb alts nivells de reticulòcits circulants presenta una clara captació d'aminoàcids, destacant enormement la de glutamina i d'alanina, els quals són captats unes 5-10 vegades més que els altres aminoàcids. La captació d'alanina per part del fetge és una dada prou descrita tant en rata (Yamamoto i col., 1974; Rémésy i col., 1978; Brosnan i col., 1983), en humans (Felig i col., 1973 entre d'altres), en gos (Elwyn i col., 1968) i en be (Heitmann i Bergman, 1980). Es probable que tanta alanina captada tingui un significat gluconeogenètic, i això pot ser una conseqüència de que els nostres animals es trobin en una situació de manca de nutrients. La gran captació de glutamina contrasta fortament amb el que trobàvem en rates normals. Aquestes darreres produïen glutamina. La glutamina captada pot contribuir a la síntesi d'urea. Si fos així, aquesta síntesi hauria d'estar molt incrementada ja que l'alanina és també una font, generalment la principal, de

la urea (McDonald i col., 1976; Phromphetcharat i col., 1981 entre d'altres). Només alanina i glutamina sumen uns 5000 nmols/min que capta el fetge.

Pel que respecte al paper dels reticulòcits en el balanç hepàtic d'aminoàcids podem dir que el fetge capta aminoàcids de les dues fraccions sanguínies indistintament, per a la majoria d'aminoàcids. Pels casos més importants quantitativament com eren la glutamina i l'alanina la captació es realitza únicament de la fracció corpuscular de la sang. Aquests resultats contrasten amb els que havíem obtingut de rates normals, en les que veiem una clara tendència del fetge a captar aminoàcids de la fracció plasmàtica de la sang i a alliberar aminoàcids en la fracció corpuscular sanguínia.

V.4.5. Balanç esplàncnic d'aminoàcids.

Donat que l'intestí apenes allibera aminoàcids a la circulació (gràfica IV.4.1) i el fetge presenta una captació de bastants aminoàcids (gràfica IV.4.3) el llit esplàncnic es troba en un balanç positiu, entés com a tendència (gràfica IV.4.5). Per tant els teixits extrahepàtics han d'alliberar aminoàcids a la circulació sobretot de glutamina i d'alanina. Aquests resultats ens porten a la possibilitat de que les condicions dels animals no siguin normals i es trobin en una situació de manca de nutrients (Felig i col., 1973; Aikawa i col., 1973; Rémésy i Demigné, 1983 entre d'altres).

En aquest balanç esplàncnic els reticulòcits no semblen que tinguin un paper especial considerant de forma general els aminoàcids (gràfica IV.4.6) contrastant altra vegada amb els resultats de rates normals (gràfica IV.1.6) on clarament es veia un distinció de funció entre la fracció corpuscular

i la plasmàtica.

V.5. CONSIDERACIONS GLOBALES. INTEGRACIÓ DELS RESULTATS.

En analitzar de forma global tots els resultats d'aquesta memòria el primer que s'ha de constatar és que els eritròcits s'han de tenir en compte a l'hora de mesurar el transport d'aminoàcids entre els diferents òrgans de la rata, sobretot pel que respecte als teixits esplànctics en les nostres condicions. Els nostres resultats, però, no indiquen una funció concreta i determinada pel transport d'aminoàcids via els eritròcits, com per exemple la que proposava Elwyn en el gos, segons la qual els eritròcits serien els encarregats de transportar els aminoàcids del fetge als teixits perifèrics. Amb el nostre disseny experimental, per altra banda, és difícil arribar a alguna conclusió d'aquest tipus perquè només estem estudiant una situació concreta i no sabem com es comportarien els eritròcits si el flux general fos un altre.

La impressió que tenim en analitzar els resultats és que cada teixit estudiat sembla que es comporta de forma diferent. Alguns teixits no distingeixen entre aminoàcids del plasma o dels eritròcits a l'hora de captar-ne o alliberar-ne, mentre que d'altres només capten de, o alliberen a, una fracció sanguínia. Aquests comportaments dels teixits, i això creiem que és important, semblen absolutament independents dels aminoàcids individuals. Amb això volem dir que si intentem analitzar les dades de la participació dels eritròcits en el transport entre els òrgans d'aminoàcids, des d'un punt de vista d'intentar establir grups d'aminoàcids més o menys transportats per aquesta via, la conclusió que s'extreu és que tots els aminoàcids semblen poder ser transportats per aquesta via en un o altre teixit. Sempre que analitzem les dades des d'un punt de vista dels aminoàcids individuals anem a parar a una discussió dels teixits. Creiem que això té importància

perquè el tema de la possible participació dels eritròcits en el transport d'aminoàcids "in vivo", ha tingut sempre una de les seves més grans dificultats en la "contradicció" entre la capacitat de transportar aminoàcids que presenten "in vitro" els eritròcits i un paper actiu "in vivo". S'acostuma a plantejar el problema des del punt de vista de l'aminoàcid i de l'eritròcit. Les nostres dades van més orientades cap a considerar que, com algun comentari s'ha fet a la bibliografia, potser "in vivo" les característiques del transport siguin diferents, ja sigui perquè estiguin implicats altres mecanismes o essent bàsicament els mateixos estiguin estimulats o regulats d'alguna forma. Som conscients de que estem entrant en un terreny quasi filosòfic i que no aportem cap demostració de res, sinó simplement impressions (que no creiem, però, que siguin gratuïtes, com intentem establir en aquest apartat).

Continuant amb l'anàlisi global podem veure que l'estudi de les concentracions intraeritrocitàries d'aminoàcids respecte a les plasmàtiques (la relació E/P) estan relacionades amb les capacitats de transport d'aminoàcids que hem vist que tenen els eritròcits. El que podem observar, des d'un punt de vista general, és que aquells aminoàcids que "in vitro" s'equilibren més ràpidament són els que presenten la relació E/P més propera a 1. I que aquells aminoàcids que són lents d'equilibrar-se "in vitro" són els que assoleixen una relació E/P més elevada, és a dir que són els més concentrats respecte a la concentració en el plasma. Per tant, doncs, sembla que aquests sistemes de transport descrits "in vitro" tenen alguna funció "in vivo". A aquesta idea arribà també el grup de Young en observar concentracions d'aminoàcids eritrocitaris alterades en eritròcits de be i cavall als que els mancava un sistema de transport determinat.

D'entrada es pot entendre bé el que si un aminoàcid es pot equilibrar ràpidament, la concentració dins l'eritròcit tendeixi a assemblar-se a la del medi que l'envolta, el plasma, i assolir per tant una relació E/P de 1 ó al voltant de 1. En el cas de que es tracti d'un aminoàcid d'equilibri molt més lent, però que "in vitro" l'eritròcit pot acumular-lo, encara que sigui després de 30 minuts, ó 1 ó 2 hores d'haver començat la incubació, també es pot explicar que la relació E/P sigui més gran de 1, que vol dir que està més concentrat a dins l'eritròcit que en el plasma.

Si en comptes d'observar la relació E/P, que és una relació estàtica, comparem les característiques del transport "in vitro" amb la capacitat d'omplir-se ó buidarse dels diferents aminoàcids que tenen els eritròcits en passar pel llit vascular d'un teixit, aleshores la relació desapareix. Es a dir que aminoàcids que "in vitro" tenen un transport molt lent, veiem que "in vivo" els eritròcits el capten ó l'alliberen en qüestió de segons. S'ha suggerit per Elwyn i col.laboradors que aquesta contradicció es pot explicar si existís un contacte directe de les membranes del eritròcit amb les membranes de les cel.lules tissulars. Sigui com sigui, el fet es que proposen que els sistemes descrits "in vitro" no són els implicats en el transport "in vivo", conclusió a la que també arribem nosaltres.

Nosaltres proposem que són els teixits, mitjançant mecanismes que ara per ara desconeixem, els que regulen ó manen la funció dels eritròcits en el transport "in vivo", Els mecanismes responsables han d'alterar la permeabilitat de la membrana de l'eritròcit, ja sigui l'esmentat contacte de les dues membranes, ja sigui la presència d'algun factor específic i concret en el teixit. El fet de que els eritròcits i el plasma puguin tenir papers diferents comporta que el teixit ha de tenir unes capacitats

especialitzades zonals inèdites fins ara i realment molt difícil de comprovar experimentalment. L'únic que podem dir és que ens trobem davant d'uns resultats - no només els d'aquesta memòria, evidentment- als que els nostres coneixements no donen una explicació satisfactòria. L'alta complexitat tecnològica que implica l'estudi d'aquestes consideracions no pot ésser una excusa per a ignorar-les. Ja són massa les evidències que indiquen, sota els més variats aspectes, l'existència d'una via de transport eritrocitària entre els òrgans, i des de la primera descripció del fet ben poc s'ha avançat en la seva comprensió. Esperem que això canviï.



VI. CONCLUSIONS

- 1- Els eritròcits .tenen un important paper en el flux interòrgans d'aminoàcids en la rata. Aquest paper sembla ser, sobretot pels teixits del llit esplàncnic, independent al del plasma. No hi ha, però, un model de comportament igual per a tots els aminoàcids. Les diferències obtingudes en els diferents teixits semblen indicar un control específic i concret del transport d'aminoàcids via els eritròcits per a cada òrgan.
- 2- La maduració de reticulòcit a eritròcit implica una disminució en la $V_{m\grave{a}x}$ i un augment de la K_m del transport d'aquells aminoàcids que són transportats per sistemes dependents de sodi, però no implica la desaparició total d'aquests sistemes.
- 3- Els resultats mostren que existeix una relació entre les característiques del transport d'aminoàcids, tal i com s'han descrit "in vitro", i la relació de concentracions d'aminoàcids intracel.lulars/plasmàtics, tant en eritròcits com en reticulòcits.
- 4- No sembla existir relació, però, amb la capacitat dels eritròcits de transportar aminoàcids entre els òrgans, la qual cosa suggereix que els sistemes de transport d'aminoàcids descrits "in vitro" no estan, al menys de forma principal, directament implicats en el transport d'aminoàcids entre els òrgans via els eritròcits.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, H.
Adenosine 5'-triphosphate determination with
phosphoglycerate kinase.
a: Methods of enzymatic analysis. ed. H.U. Bergmeyer.
Academic Press New York pp 539-543 (1963).
- ADIBI, S.
Metabolism of branched chain amino acids in altered
nutrition.
Metabolism 25, 1287-1302 (1976).
- ADIBI, S.A., MODESTO, T.A., MORSE, E.J., AMIN, P.M.
Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle
during protein deprivation.
Am.J.Physiol. 225, 408-414 (1973).
- AHOKAS, R.A., REYNOLDS, S.L., ANDERSON, G.D., LIPSHITZ, J.
Maternal organ distribution of cardiac output in the diet-
restricted pregnant rat.
J.Nutr. 114, 2262-2268 (1984).
- AIKAWA, T., MATSUTAKA, H., YAMAMOTO, H., OKUDA, T., ISHIKAWA, E., -
KAWANO, T., MATSUMURA, E.
Gluconeogenesis and amino acid metabolism. II. Interorganal
relations and roles of glutamine and alanine in the
amino acid metabolism of fasted rat.
J.Biochem. 74, 1003-1017 (1973).
- ALPERS, D.H.
Uptake and fate of absorbed amino acids and peptides in
the mammalian intestine.
Federation Proc. 45, 2261-2267 (1986).
- ALPERS, D.H., THIER, S.O.
Role of the free amino acid pool of the intestine in
protein synthesis.
Biochim.Biophys.Acta 262, 535-545 (1972).
- AL-SALEH, I., WHEELER, K.P.
Transport of neutral amino acids by human erythrocytes.
Biochim.Biophys.Acta 684, 157-171 (1982).
- AMADOR, E., WACHER, W.E.C.

Serum glutamic-oxalacetic transaminase activity: a new modification and analytical assessment of current assay technics.

Clin.Chem. 8, 343-351 (1962).

- ANTONIOLI, J.A., CHRISTENSEN, H.N.
Differences in schedules of regression of transport systems during reticulocyte maturation.
J.Biol.Chem. 244, 1505-1509 (1969).
- AOKI, T.T., BRENNAN, M.F., MULLER, W.A., MOORE, F.D., CAHILL, G.F.
Effect of insulin on muscle glutamate uptake. Whole blood versus plasma glutamate uptake.
J.Clin.Invest. 51, 2889-2894 (1972).
- AOKI, T.T., BRENNAN, M.F., MULLER, W.A., SOELDNER, J., ALPERT, S., SALZ, S.B., KAUFFMAN, R.L., TAN, M.H., CAHILL, G.F.
Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal.
Am.J.Clin.Nutr. 29, 340-350 (1976).
- AOKI, T.T., MULLER, W.A., BRENNAN, M.F., CAHILL, G.F.
Blood cell and plasma amino acid levels across forearm muscle during a protein meal.
Diabetes 22, 768-775 (1973).
- ARDAWI, M.S.M., NEWSHOLME, E.A.
Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat.
Hopp-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, 1251 (1983).
- ATKINSON, D.E., CAMIEN, M.N.
The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH.
Curr.Top.Cell.Regul. 21, 261-303 (1982).
- ATWELL, J.R., HEDDEN, M.P., MANCUSI, V.S., BUSE, M.G.
Diabetes 26 (Suppl 1): Abst 81 (1977).
- BENDEROFF, S., BLOSTEIN, R., JOHNSTONE, R.M.
Changes in amino acid transport during red cell maturation.
Membrane Biochem. 1, 89-106 (1978).

- BERGMAN, E.N., HEITMANN, R.N.
Metabolism of amino acids by the gut, liver, kidneys and peripheral tissues.
Federation Proc. 37, 1228-1232 (1978).
- BLOOMGARDEN, Z.T., LILJENQUIST, J., LACY, W., RABIN, P.
Amino acid disposition by liver and gastrointestinal tract after protein and glucose ingestion.
Am.J.Physiol. 241, E90-E99 (1981).
- BORMAN, A., WOOD, T.R., BLACK, H.C., ANDERSON, E.G., OSTERLING, M. J., WOMACK, M., ROSE, W.C.
The role of arginine in growth with some observations on the effects of argininic acid.
J.Biol.Chem. 166, 585-594 (1946).
- BOURDEL, G., KADNDE, J., ROBIN, D., ROBIN, P.
Quantitative and qualitative circadian variations of amino acid intestinal efflux in mixed-fed and protein-meal-fed rats.
J.Nutr. 111, 1528-1535 (1981).
- BRANEMARK, P.I.
Intracapillary rheological phenomena.
Intern.Congr.Rheol.4th Symp.Biorheol.part 4, 459-473 (1965).
- BRECHER, G., SCHENIDERMAN, M., WILLIAMS, G.Z.
Evaluation of electronic red blood cell counter.
Amer.J.Clin.Path. 26, 1439-1448 (1956).
- BRONK, J.R., PARSONS, D.S.
Amino acid accumulation and incorporation in rat intestine "in vitro".
J.Physiol.(London) 184, 950-963 (1966).
- BROSNAN, J.T., FORSEY, G.P., BROSNAN, M.E.
Uptake of tyrosine and leucine "in vivo" by brain of diabetic and control rats.
Am.J.Physiol. 247, C450-C453 (1984).
- BROSNAN, J.T., MAN, K.-C., HALL, D.E., COLBOURNE, S.A., BROSNAN, M.E.

Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rat.

Am.J.Physiol. 244, E151-E158 (1983).

- BROSANAN, M.E., LOWRY, A., WASI, Y., LOWRY, M., BROSANAN, J.T.
Regional and subcellular distribution of enzymes of branched-chain amino acid metabolism in brains of normal and diabetic rats.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 63, 1234-1238 (1985).
- BUCKER, T.,
Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment
Biochim.Biophys.Acta 1, 292-301 (1947).
- BUELKE-SAM, J., NELSON, C.J., BYRD, R.A., HOLSON, J.F.
Blood flow during pregnancy in the rat: I. Flow patterns to maternal organs.
Teratology 26, 269-277 (1982).
- BUSE, M.G., REID, S.S.
Leucine as a possible modulator of protein turnover in muscle.
J.Clin.Invest. 56, 1250-1261 (1975).
- CAHILL, G.F., AOKI, T.T., SMITH, R.J.
Amino acid cycles in man.
Curr.Top.Cell.Regul. 18, 389-400 (1981).
- CALDECOURT, M.A., COX, D.J., SUDGEN, M.C., PALMER, T.N.
Glycolytic origin of alanine formed in rat diaphragm muscle "in vitro".
Biochem.J. 231, 801-804 (1985).
- CAMMARATA, P.S., COHEN, P.P.
The scope of the transamination reaction in animal tissues.
J.Biol.Chem. 187, 439-452 (1950).
- CARR, F.P.A., POGSON, C.I.
Phenylalanine metabolism in isolated rat liver cells: effects of glucagon and diabetes.
Biochem.J. 198, 655-660 (1981).

- CHANG, T.W., GOLDBERG, A.L.
The origin of alanine produced in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 253, 3677-3684 (1977).
- CHAPLIN, E.R., GOLDBERG, A.L., DIAMOND, I.
Leucine oxidation in brain slices and nerve endings.
J.Neurochem. 26, 701-707 (1976).
- CHRISTENSEN, H.N.
Interorgan amino acid metabolism.
Physiol.Rev. 62, 1193-1233 (1982).
- CHRISTENSEN, H.N.
Hypothesis: Control of hepatic utilization of alanine by membrane transport or by cellular metabolism?
Biosci.Rep. 3, 905-913 (1983).
- CHRISTENSEN, H.N.
Exploiting amino acid structure to learn about membrane transport.
Advan.Enzymol. 49, 41-101 (1979).
- CHRISTENSEN, H.N.
On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems.
J.Membrane Biol. 84, 97-103 (1985).
- CHRISTENSEN, H.N., ANTONIOLI, J.A.
Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte.
J.Biol.Chem. 244, 1497-1504 (1969).
- CHRISTENSEN, H.N., LIANG, M., ARCHER, E.G.
A distinct Na^+ -requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids.
J.Biol.Chem. 242, 5237-5246 (1967).
- CHRISTENSEN, H.N., RIGGS, T.R., FISCHER, H., PALATINE, I.M.
Amino acid concentration by free cell neoplasm: relation among amino acids.
J.Biol.Chem. 198, 1-11 (1952).
- COULSON, R.A., HERNANDEZ, T.
Amino acid catabolism in the intact rat.
Am.J.Physiol. 215, 741-746 (1968).

- CSAKY, T.Z.
A possible link between active transport of electrolytes and non-electrolytes
Federation Proc. 22, 3-6 (1963).
- CSAKY, T.Z., THALE, M.
Effect of ionic environment on intestinal sugar transport.
J. Physiol. 151, 59-66 (1960).
- DALL'ASTA, V., GAZZOLA, G.C., FRANCHI-GAZZOLA, R., BUSSOLATI, O., LONGO, N., GUIDOTTI, G.G.
J. Biol. Chem. 258, 6371-6379 (1983).
- DAVIDSON, N.
Neurotransmitter amino acids.
Academic Press New York (1976).
- DRABKIN, D.L., AUSTIN, J.H.
Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin.
J. Biol. Chem. 112, 51-60 (1935).
- DREWES, L.R., CONWAY, W.P., GILBOE, D.D.
Net amino acid transport between plasma and erythrocytes and perfused dog brain.
Am. J. Physiol. 233, E320-E325 (1977).
- EAVENSON, E., CHRISTENSEN, H.N.
Transport systems for neutral amino acids in the pigeon erythrocyte.
J. Biol. Chem. 242, 5386-5396 (1967).
- ELIA, M., FARRELL, R., ILIC, V., SMITH, R., WILLIAMSON, D.H.
The removal of infused leucine after injury, starvation and other conditions in man.
Clin. Sci. 59, 275-283 (1980).
- ELIA, M., NEALE, G., LIVESEY, G.
Alanine and glutamine release from the forearm: effects of glucose administration.
Clin. Sci. 69, 123-133 (1985).

- ELLORY, J.C., JONES, S.E.M., YOUNG, J.D.
Glycine transport in human erythrocytes.
J.Physiol. 320, 403-422 (1981).
- ELWYN, D.H.
Distribution of amino acids between plasma and red cells
in the dog.
Federation Proc. 25, 854-861 (1966).
- ELWYN, D., H., LAUNDER, W.J., PARIKH, H., C., WISE, E.M.
Roles of plasma and erythrocytes in interorgan transport
of amino acids in dogs.
Am.J.Physiol. 222, 1333-1342 (1972).
- ELWYN, D.H., PARIKH, H.C., SHOEMAKER, W.C.
Amino acid movements between gut, liver and periphery in
unanesthetized dogs.
Am.J.Physiol. 215, 1260-1275 (1968).
- FEATHERSTON, W.R., ROGERS, Q.R., FREEDLAND, R.A.
Relative importance of kidneys and liver in synthesis of
arginine by the rat.
Am.J.Physiol. 224, 127-129 (1973).
- FAFOURNOUX, P., DEMIGNE, C., REMESY, C.
Bidirectional transport of glutamine across the cell
membrane in rat liver.
Biochem.J. 216, 401-408 (1983).
- FAFOURNOUX, P., REMESY, C., DEMIGNE, C.
Stimulation of amino acid transport into liver cells from
rats adapted to a high-protein diet.
Biochem.J. 206, 13-18 (1982).
- FAFOURNOUX, P., REMESY, C., DEMIGNE, C.
Control of alanine metabolism in rat liver by transport
processes or cellular metabolism.
Biochem.J 210, 645-652 (1983).
- FELIG, P.
Amino acid metabolism in man.
Annu.Rev.Biochem. 44, 933-955 (1975).

- FELIG, P., OWEN, O.E., WAHREN, J., CAHILL, G.F.
Amino acid metabolism during prolonged starvation.
J.Clin.Invest. 48, 584-594 (1969).
- FELIG, P., POZEFSKRY, T., MARKISS, E., CAHILL, G.F.
Alanine: key role in gluconeogenesis.
Science 167, 1003-1004 (1970).
- FELIG, P., WAHREN, J.
Amino acid metabolism in exercising man.
J.Clin.Invest. 50, 2703-2714 (1971).
- FELIG, P., WAHREN, J., RAF, L.
Evidence of inter-organ amino acid transport by blood cells in humans.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70, 1775-1779 (1973).
- FELIG, P., WAHREN, J., KARL, I., CERASI, E., LUFT, R., KIPNIS, D.M.
Glutamine and glutamate metabolism in normal and diabetic subjects.
Diabetes 22, 573-576 (1973).
- FERNSTROM, J.D., WURTMAN, R.J., HAMMARSTROM-WIKLUND, B., RAND, W.M., MUNRO, H.N., DAVIDSON, C.S.
Diurnal variations in plasma neutral amino acid concentrations among patients with cirrhosis: effect of dietary protein.
Am.J.Clin.Nutr. 32, 1923-1933 (1979).
- FINCHAM, D.A., MASON, D.K., YOUNG, J.D.
Characterization of a novel Na⁺-independent amino acid transporter in horse erythrocytes.
Biochem.J. 227, 13-20 (1985).
- FINCHAM, D.A., WILLIS, J.S., YOUNG, J.D.
Red cell amino acid transport. Evidence for the presence of system GLY in guinea pig reticulocytes.
Biochim.Biophys.Acta 777, 147-150 (1984).
- FINCHAM, D.A., YOUNG, J.D.
Breed and species comparison of amino acid transport variation in equine erythrocytes.
Res.Vet.Sci. 38, 346-351 (1985).

- FISCHER, J.E., ROSEN, H.M., EBEID, A.M., JAMES, J.H., KEANE, J.M., SOETERS, P.B.
The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man.
Surgery 80, 77-82 (1976).
- FREEMAN, H.J., KIM, Y.S.
Digestion and absorption of protein.
Annu.Rev.Med. 29, 99-116 (1978).
- FUJITA, Y., YAMAMOTO, Y., RIKIMARU, T., EBISAWA, H., INOUE, G.
Effects of dietary protein or amino acids in the perfusion medium on amino acid metabolism in perfused adult rat liver.
J.Nutr.Sci.Vitaminol. 27, 149-163 (1981).
- FUKUDA, S., KOPPLE, J.D.
Uptake and release of amino acids by the normal dog kidney.
Mineral electrolyte Metab. 3, 237-247 (1980).
- FULKS, R.M., LI, J.B., GOLDBERG, A.L.
Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm.
J.Biol.Chem. 250, 290-298 (1975).
- GARLICK, P.J.
Protein turnover in the whole animal and specific tissues.
a: Comprehensive biochemistry:protein metabolism.
Florkin, M., Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M eds. Amsterdam-Elsevier 77-152 (1980).
- GARBER, A.J., KARL, I.E., KIPNIS, D.H.
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Glycolysis and amino acid release.
J.Biol.Chem. 251, 826-835 (1976a).
- GARBER, A.J., KARL, I.E., KIPNIS, D.H.
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis.

- J.Biol.Chem. 251, 836-843 (1976b).
- GASKIN, J.
The design of a new pulsed-field electromagnetic flowmeter.
Biomed.Engineering Nov, 2-22 (1972)
 - GAZZOLA, G.C., DALL'ASTA, V., BUSSOLATI, O., MAKOWSKE, M., CHRISTENSEN, H.N.
J.Biol.Chem. 256, 6054-6059 (1981).
 - GELFAND, R.A., GLICKMAN, M.G., JACOB, R., SHERWIN, R.S., DEFRONZO, R.
Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans
Am.J.Physiol. 250, E407-E413 (1986).
 - GOLDBERG, A.L., CHANG, T.W.
Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle.
Federation Proc. 37, 2301-2307 (1978).
 - GOLDBERG, A.L., ODESSEY, R.
Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats.
Am.J.Physiol. 223, 1384-1391 (1972).
 - GUIDOTTI, G.G., BORGHETTI, A.F., GAZZOLA, G.C.
The regulation of amino acid transport in animal cells.
Biochem.Biophys.Acta 515, 329-366 (1978).
 - GUIDOTTI, G.G., GAZZOLA, G.C., BORGHETTI, A.F., FRANCHI-GAZZOLA, R.
Adaptive regulation of amino acid transport across the cell membrane in avian and mammalian tissues.
Biochim.Biophys.Acta 406, 264-279 (1975).
 - HAGENFELDT, L., ARVIDSSON, A.
The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes.
Clin.Chim.Acta 100, 133-141 (1980).
 - HALEY, C.J., HARPER, A.E.
Glucagon stimulation of phenylalanine metabolism. The

- effect of acute and chronic treatment.
Metabolism 31, 524-532 (1982).
- HALPERIN, M., L., JUNGAS, R. L.
The metabolic production and renal disposal of hydrogen ions: an examination of the biochemical processes.
Kidney int. 24, 709-713 (1983).
 - HAYES, M. R., MCGIVAN, J. D.
Differential effects of starvation on alanine and glutamine transport in isolated rat hepatocytes.
Biochem.J. 204, 365-368 (1982).
 - HAYMOND, M. W., MILES, J. M.
Branched-chain amino acids as a major source of alanine nitrogen in man.
Diabetes 31, 86-89 (1982).
 - HEITMANN, R. N., BERGMAN, E. N.
Integration of amino acid metabolism in sheep: effects of fasting and acidosis.
Am.J.Physiol. 239, E248-E254 (1980).
 - HEITMANN, R. N., BERGMAN, E. N.
Transport of amino acids in whole blood and plasma of sheep.
Am.J.Physiol. 239, E242-E247 (1980).
 - HENRY, R. J., CHIAMORI, N., GOLUB, O. J., BERKMAN, S.
Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic dehydrogenase.
Amer.J.Clin.Path. 34, 381-390 (1960).
 - HITIER, Y., CHAMPIGNY, O., HAMAYOON, P., BOURDEL, G.
Circadian feeding in pregnant rats fed three levels of protein.
Ann.Nutr.Metab. 26, 129-137 (1982).
 - HOPFER, U., SIGRIST-NELSON, K., AMMANN, E., MURER, K.
Differences in neutral amino acid and glucose transport between brush border and basolateral plasma membrane of intestinal epithelial cell.

- J.Cell.Physiol. 89, 805-810 (1976).
- HUGHES, W.A., HALESTRAP, A.P.
The regulation of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase of liver, kidney and heart by phosphorylation.
Biochem.J. 196, 459-469 (1981).
 - HUTSON, S.M., ZAPALOWSKI, C., CREE, T.C., HARPER, A.E.
Regulation of leucine and α -ketoisocaproic acid metabolism in skeletal muscle. Effects of starvation and insulin.
J.Biol.Chem. 255, 2418-2426 (1978).
 - HUXTABLE, R.J., LIPPINCOTT, S.E.
Diet and biosynthesis as a source of taurine in the mouse.
J.Nutr. 112, 1003-1010 (1982).
 - INABA, M., MAEDE, Y.
Increase of Na^+ gradient-dependent L-glutamate and L-aspartate transport in high K^+ dog erythrocytes associated with high activity of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase.
J.Biol.Chem. 259, 312-317 (1984).
 - INUI, Y., CHRISTENSEN, H.N.
The Na^+ -sensitive transport of neutral amino acids in the Ehrlich cell.
J.Gen.Physiol. 50, 203-224 (1966).
 - JANICKI, R.H., COLDSTEIN, L.
Glutamine synthetase and renal ammonia metabolism.
Am.J.Physiol. 216, 1107-1110 (1969).
 - KADOWAKI, M., NOGUCHI, T., NAITO, H.
Regulation of plasma amino acid levels by perfusion of hindquarters of rats.
J.Nutr.Sci.Vitaminol. 30, 187-198 (1984).
 - KATZ, J., GOLDEN, S., WALS, P.A.
Stimulation of hepatic glycogen synthesis by amino acids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 3433-3437 (1976).
 - KILBERG, M.S.
Amino acid transport in isolated rat hepatocytes.

- J.Membrane Biol. 69, 1-12 (1982).
- KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E., CHRISTENSEN, H.N.
Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs.
J.Biol.Chem. 255, 4011-4019 (1980).
 - KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E., CHRISTENSEN, H.N.
Characteristics of system ASC for transport of neutral amino acids in the isolated rat hepatocyte.
J.Biol.Chem. 256, 3304-3312 (1981).
 - KING, G.F., KUCHEL, P.W.
Assimilation of γ -glutamyl-peptides by human erythrocytes: A possible means of glutamate supply for glutathione synthesis.
Biochem.J. 227, 833-842 (1985).
 - KOPPLE, J.D., FUKUDA, S.
Effects of amino acid infusion and renal failure on the uptake and release of amino acids by the dog kidney.
Am.J.Clin.Nutr. 33, 1363-1372 (1980).
 - KOSER, B.H., CHRISTENSEN, H.N.
Biochim.Biophys.Acta 241, 9-19 (1971).
 - LARDEUX, B., BOURDEL, G., GIRARD-GLOBA, A.
Regulation of hepatic synthesis of proteins by the chronology of protein ingestion.
Biochim.Biophys.Acta 518, 113-124 (1978).
 - LAZARUS, P., PANASCI, L.C.
Characterization of L-threonine and L-glutamine transport in murine P388 leukemia cells in vitro. Presence of an N-like amino acid transport system.
Biochim.Biophys.Acta 856, 488-495 (1986).
 - LE CAM, A., FREYCHET, P.
Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L systems in isolated rat hepatocytes.
J.Biol.Chem. 252, 148-156 (1977).

- LEE, J.W., BEYGU-FARBER, S., VIDAVER, G.A.
Glycine transport by membrane vesicles from pigeon red cells.
Biochim.Biophys.Acta 298, 446-459 (1973).
- LERNER, J., HILCHEY, S.E., SMAGULA, R.M.
Developmental changes in amino acid transport in the chicken erythrocyte.
Comp.Biochem.Physiol. 74A, 881-884 (1983).
- LERNER, J., LARIMORE, D.L.
Comparative aspects of the apparent michaelis constant for neutral amino acid transport in several animal tissues.
Comp.Biochem.Physiol. 84B, 235-248 (1986).
- LERNER, J., SMAGULA, R.M., HILCHEY, S.E., SOMES, R.G.
Amino acid transport and intracellular Na⁺ and K⁺ content of chicken erythrocytes genetically selected for high and low leucine transport activity.
Comp.Biochem.Physiol. 73A, 243-248 (1982).
- LIEB, W.R., STEIN, W.D.
Testing and characterizing the simple pore.
Biochim.Biophys.Acta 373, 165-177 (1974b).
- LIEB, W.R., STEIN, W.D.
Testing and characterizing the simple carrier.
Biochim.Biophys.Acta 373, 178-196 (1974b).
- LIEB, W.R., STEIN, W.D.
Testing the simple carrier using irreversible inhibitors.
Biochim.Biophys.Acta 455, 913-927 (1976).
- LOGAN, W.J., SNYDER, S.H.
Nature (Lond.) 234, 297-299 (1971).
- LOPEZ-BURILLO, S., GARCIA-SANCHO, J., HERREROS, B.
Tryptophan transport through transport system T in the human erythrocyte, the Ehrlich cell and the rat intestine.
Biochim.Biophys.Acta 820, 85-94 (1985).
- LOPEZ-TEJERO, D., PASTOR-ANGLADA, M., REMESAR, X.
Blood essential amino acid compartmentation in young and adult rats.

- IRCS.Med.Sci. 13, 296-197 (1985).
- LOPEZ-TEJERO, D., PASTOR-ANGLADA, M., REMESAR, X.
Blood amino acid compartmentalization during pregnancy and lactation in the rat.
Ann.Nutr.Metab. 30, 58-65 (1986).

 - MACDONALD, M., NEUFELDT, N., PARK, B.N., BERGER, M., RUDERMAN, N.
Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat.
Am.J.Physiol. 231, 619-625 (1976).

 - MALLETTE, L.E., EXTON, J.H., PARK, C.R.
Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver.
J.Biol.Chem. 244, 5713-5723 (1969).

 - MANCHESTER, K.L.
Insulin and protein metabolism in muscle.
Biochim.Biophys.Acta 100, 295-298 (1965).

 - MANILLIER, C., VINAY, P., LALONDE, L., NOEL, J., GOUGOUX, A., HALPERIN, M.L.
ATP turnover and glutamine metabolism by dog kidney tubule.
Contr.Nephrol. 47, 78-86 (1985).

 - MCCORMICK, M.E., WEBB, K.E.
Plasma free, erythrocyte free and plasma peptide amino acid exchange of calves in steady state and fasting metabolism.
J.Nutr. 112, 276-282 (1982).

 - MCNENAMY, R.H., LUND, C.C., NEVILLE, G.J., WALLACH, D.F.H.
Studies of unbound amino acid distributions in plasma, erythrocytes, leucocytes and urine on normal human subjects.
J.Cli.Invest. 39, 1675-1687 (1960).

 - MILLER, L.L., BURKE, W.T., HAFT, D.E.
Amino acid metabolism studies with the isolated perfused rat liver.
a: Some aspects of amino acid supplementation Cole, W.H. ed

- New Brunswick: Rutgers University Press. 44-59 (1956)
- MIRCHEFF, A.K., VANOS, C.K., WRIGHT, E.M.
Pathways for alanine transport in intestinal basal lateral membrane vesicles.
J. Membrane Biol. 52, 83-92 (1980).
 - MITCH, W.E., CHAN, W.
Transamination of branched-chain keto acids by isolated perfused rat kidney.
Am. J. Physiol. 235, E47-E52 (1978).
 - MITCH, W.E., CHESNEY, R.W.
Amino acid metabolism by the kidney.
Mineral Electrolyte Metab. 9, 190-202 (1983).
 - MUNCK, B.G.
Transport of neutral and cationic amino acids across the brush-border membrane of rabbit ileum.
J. Membrane Biol. 83, 1-13 (1985a).
 - MUNCK, B.G.
Transport of imino acids and non- α -amino acids across the brush-border membrane of the rabbit ileum.
J. Membrane Biol. 83, 15-24 (1985b).
 - MUNRO, H.N.
Interactions of liver and muscle in the regulation of metabolism in response to nutritional and other factors.
a: The liver: Biology and Pathobiology. Arias, I., Popper, K. Schachter, D., Shafritz, D.A. eds. Raven Press. New York 677-691 (1982).
 - MUNRO, H.N., FERNSTROM, J.D., WURTMAN, R.J.
Insulin, plasma amino acid imbalance, and hepatic coma.
Lancet 1, 722-724 (1975).
 - MURER, H., KINNE, R.
The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes.
J. Membrane Biol. 55, 81-95 (1980).
 - NAKAMURA, T., NODA, C., ICHIHARA, A.

Two phase regulation of tyrosine aminotransferase activity by insulin in primary cultured hepatocytes of adult rats. Biochim.Biophys.Res.Comm. 99, 775-780 (1981).

- NISSIM, I., YUDKOFF, M., SEGAL, S.
Metabolism of glutamine and glutamate by rat renal tubules: study with ¹⁵N and gas chromatography-mass spectrometry.
J.Biol.Chem. 260, 13955-13967 (1985).

- ODESSEY, R., GOLDBERG, A.L.
Oxidation of leucine by rat skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 223, 1376-1383 (1972).
- ODESSEY, R., KHAIRALLAH, E., GOLDBERG, A.L.
Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 249, 7623-7629 (1974).
- OLDENDORF, W.H.
Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection.
Am.J.Physiol. 221, 1629-1639 (1971).
- OLDENDORF, W.H., SZABO, J.
Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers.
Am.J.Physiol. 230, 94-98 (1976).
- OWEN, O.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J., CAHILL, G.F.
Liver and kidney metabolism during prolonged starvation.
J.Clin.Invest. 48, 574-583 (1969).
- OWEN, O.E., ROBINSON, R.R.
Amino acid extraction and ammonia metabolism by the human kidney during prolonged administration of ammonium chloride.
J.Clin.Invest. 42, 263-276 (1963).
- OXENDER, D.L., CHRISTENSEN, H.N.
Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell.

- J.Biol.Chem. 238, 3686-3699 (1963).
- PARDRIDGE, W.M., OLDENDORF, W.H.
Transport of metabolic substances through the blood-brain barrier.
J.Neurochem. 28, 5-12 (1977).
 - PARDRIDGE, W.M.
Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier.
Physiol.Rev. 63, 1481-1535 (1983).
 - PASTOR-ANGLADA, M., REMESAR, X.
No significant uptake of branched chain amino acids by the liver of fed-mid pregnant rats.
Biochem.Int. 12, 957-962 (1986).
 - PASTOR-ANGLADA, M., REMESAR, X.
Metabolismo de aminoácidos en la madre durante la gestación.
a: Bioquímica perinatal. Coordinador E. Herrera, Fundación Ramón Areces, 29-45 (1986).
 - PASTOR-ANGLADA, M.
Metabolisme nitrogenat en la rata a meitat de gestació: cas de l'alanina.
Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona (1985).
 - PASTOR-ANGLADA, M., REMÉSAR, X., BOURDEL, G.
Alanine uptake by the liver at mid-pregnancy.
Am.J.Physiol. en prensa (1986).
 - PATERSON, J.Y.F., SEPULVEDA, F.V., SMITH, M.W.
Amino acid efflux from rabbit ileal enterocytes.
J.Physiol. 331, 537-546 (1982).
 - PHROMPHETCHARAT, V., JACKSON, A., DASS, P.D., WELBOURNE, T.C.
Ammonia partitioning between glutamine and urea: interorgan participation in metabolic acidosis.
Kidney int. 20, 598-605 (1981).
 - PITTS, R.F.
Renal production and excretion of ammonia.

- Am.J.Med. 36, 720-742 (1964).
- PITTS, R.F., DAMIAN, A.C., MACLEOD, M.B.
Synthesis of serine by rat kidney "in vivo" and "in vitro".
Am.J.Physiol. 219, 584-589 (1970).
 - PITTS, R.F., DEHAAS, J., KLEIN, J.
Relation of renal amino and amide nitrogen extraction to ammonia production.
Am.J.Physiol. 204, 187-191 (1963).
 - PITTS, R.F., PILKINGTON, L.A.
The relation between plasma concentrations of glutamine and glycine utilization as sources of urinary ammonia.
J.Clin.Invest. 45, 86-93 (1966).
 - PITTS, R.F., STONE, W.J.
Renal metabolism of alanine.
J.Clin.Invest. 46, 530-538 (1967).
 - PRENTKI, M., RENOLD, A.E.
Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets.
J.Biol.Chem. 258, 14239-14244 (1983).

 - RAIJMAN, L.
Cirtulline synthesis in rat tissues and liver content of carbomoiil phosphate and ornitine.
Bichem.J. 138, 225-232 (1974).
 - RATNER, S.
Enzymes of arginine and urea synthesis.
Adv.Enzymol. 39, 1-90 (1973).
 - REMESAR, X., AROLA, LL., PALOU, A., ALEMANY, M.
Body and organ size and composition during the breeding cycle of rats (*Rattus norvegicus*).
Lab.Anim.Sci. 31, 67-70 (1981).
 - REMESY, C., DEMIGNE, C., AUFRERE, J.
Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-

- protein diets.
Biochem.J. 170, 321-329 (1978).
- REMESY, C., FAFOURNOUX, P., DEMIGNE, C.
Control of hepatic utilization of serine, glycine and threonine in fed and starved rats.
J.Nutr. 113, 28-39 (1983).
 - RIKLIS, E., QUASTEL, J.H.
Effects of cations on sugar absorption by isolated surviving guinea pig intestine.
Can.J.Biochem.Physiol. 36, 347-351 (1958)
 - ROSENBERG, R.
A kinetic analysis of L-tryptophan transport in human red blood cells.
Biochim.Biophys.Acta 649, 262-268 (1981a)
 - ROSENBERG, R.
L-leucine transport in human red blood cells: A detailed kinetic analysis.
J.Membrane Biol. 62, 79-93 (1981b).
 - ROSENBERG, R.
Na-independent and Na-dependent transport of neutral amino acids in the human red blood cell.
Acta Physiol.Scand. 116, 321-330 (1982).
 - ROSENBERG, R., YOUNG, J.D., ELLORY, J.C.
L-tryptophan transport in human red blood cells.
Biochim.Biophys.Acta 598, 375-384 (1980).
 - RUDERMAN, N.B., BERGER, M.
The formation of glutamine and alanine in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 249, 5500-5506 (1974).

 - SADASIVUDU, B., VALLI, V.V.
Erythrocyte ATPase in amino acid transport by rat erythrocytes.
IRCS Med.Sci. 8, 825-826 (1980).
 - SALTER, M., STANLEY, J.C., FISHER, M.J., POGSON, C.I.
The influence of starvation and tryptophan administration

- on the metabolism of phenylalanine, tyrosine and tryptophan in isolated rat liver cells.
Biochem.J. 221, 431-438 (1984).
- SCHAFER, J.A., BARFUSS, D.W.
Membrane mechanisms for transepithelial amino acid absorption and secretion.
Am.J.Physiol. 238, F335-F346 (1980).
 - SCHNEIDER, E.G., SACKTOR, B.
J.Biol.Chem. 255, 7645-7656 (1980).
 - SCHROCK, H., CHA, C.-J.M., GOLDSTEIN, L.
Glutamine release from hindlimb and uptake by kidney in the acutely acidotic rat.
Biochem.J. 188, 557-560 (1980).
 - SCHROCK, H., GOLDSTEIN, L.
Interorgan relationships for glutamine metabolism in normal and acidotic rats.
Am.J.Physiol. 240, E519-E525 (1981).
 - SCHWORER, C.M., MORTIMORE, G.E.
Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 3169-3173 (1979).
 - SCRIVER, C.R., ROSENBERG, L.E.
Amino acid metabolism and its disorders.
Sanders, Philadelphia USA, 39-60 (1973).
 - SHINNICK, F.L., HARPER, A.E.
Branched-chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparations.
Biochim.Biophys.Acta 437, 477-486 (1976).
 - SIPS, H.J., DE GRAAF, P.A., VAN DAM, K.
Transport of L-aspartate and L-glutamate in plasma-membrane vesicles from rat liver.
Eur.J.Biochem. 122, 259-264 (1982).
 - SMITH, R.J.
Regulation of protein degradation in differentiated

- skeletal muscle cells in monolayer culture.
- a: Intracellular protein catabolism. Khairallah, E.A., Bond, J., Bird, J.C., New York: Liss 633-635 (1985).
- SMITH, R.J.
Role of skeletal muscle in interorgan amino acid exchange: selective release of alanine vs glutamine.
Federation Proc. 45, 2172-2176 (1986).
 - SMITH, M.
Role of skeletal muscle in interorgan amino acid exchange.
Federation Proc. 45, 2172-2176 (1986).
 - SNELL, K.
Alanine as a gluconeogenic carrier.
TIBS 4, 124-128 (1979).
 - SNELL, K.
Muscle alanine synthesis and hepatic gluconeogenesis.
Biochem.Soc.Trans. 8, 205-213 (1980).
 - SNELL, K., DUFF, D.A.
The release of alanine by rat diaphragm muscle "in vitro"
Biochem.J. 162, 399-403 (1977).
 - SNELL, K., DUFF, D.A.
Branched-chain amino acid metabolism and alanine formation in rat diaphragm muscle "in vitro". Effects of dichloroacetate.
Biochem.J. 223, 831-835 (1984).
 - SPAETH, D.G., SCHNEIDER, D.L.
Taurine synthesis, concentration and bile-salt conjugation in rat, guinea pig, and rabbit.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 147, 855-858 (1974).
 - SPYDEVOLD, O., HOKLAND, B.
Release of leucine and isoleucine metabolites by perfused skeletal muscle and liver of rat.
Int.J.Biochem. 15, 985-990 (1983).
 - SQUIRES, J.E., HALL, P.E., BROSNAN, J.T.
Arteriovenous differences for amino acids and lactate across kidneys of normal and acidotic rats.

- Biochem.J. 160, 125-128 (1976).
- STADIE, W.C.
A method for determination of methemoglobin in whole blood.
J.Biol.Chem. 41, 237-246 (1920).
 - STEVENS, B.R., KAUNITZ, J.D., WRIGHT, E.M.
Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles.
Ann.Rev.Physiol. 46, 417-433 (1984).
 - STEVENS, B.R., ROSS, H.J., WRIGHT, E.M.
Multiple transport pathways for neutral aminoacids in rabbit jejunal brush border vesicles.
J.Membr.Biol. 66, 213-225 (1982).
 - THOMAS, E.L., CHRISTENSEN, H.N.
J.Biol.Chem. 246, 1682-1688 (1971).
 - TIANNEN, R.L.
Ammonia metabolism.
Am.J.Physiol. 235, F265-F277 (1978).
 - TIZIANELLO, A., DEFERRARI, G., GARIBOTTO, G., GURRERI, G., ROBAUDO, C.,
Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency.
J.Clin.Invest. 65, 1162-1173 (1980).
 - TRIVEDI, R.C., STONG, L.J., DICKSTEIN, R., DESAI, K.
A novel method of eliminating interference from pyruvate in GOT determination.
Clin.Chem. 23, 1171-1178 (1977).
 - TUCKER, E.M., YOUNG, J.D.
Biochemical changes during reticulocyte maturation in culture.
Biochem.J. 192, 33-39 (1980).
 - ULLRICH, K.J.

Renal tubular mechanisms of organic solute transport.
Kidney Int. 9, 134-148 (1976).

- VADGAMA, J.V., CHRISTENSEN, H.N.
Discrimination of Na⁺-independent transport systems, L, T, and asc in erythrocytes: Na⁺ independence of the latter a consequence of cell maturation?
J.Biol.Chem. 260, 2912-2921 (1985).
- VIDAVER, G.A.
Transport of glycine by pigeon red cells.
Biochemistry 3, 662-667 (1964a).
- VIDAVER, G.A.
Glycine transport by hemolyzed and restored pigeon red cells.
Biochemistry 3, 795-799 (1964b).
- VIDAVER, G.A.
Some tests of the hypothesis that the sodium-ion gradient furnishes the energy for the glycine-active transport by pigeon red cells.
Biochemistry 3, 803-808 (1964c).
- VIDAVER, G.A., ROMAIN, L.F., HAUROWITZ, F.
Some studies on the specificity of amino acid entry routes in pigeon erythrocytes.
Arch.Biochem.Biophys. 107, 82-87 (1964).
- VIITALA, J., JARNEFELT, J.
The red surface revisited.
TIBS 10, 392-395 (1985).
- VINAY, P., ALLIGNET, E., PICHETTE, C., WATFORD, M., LEMIEUX, G., GOUGOUX, A.,
Changes in renal metabolite profile and ammoniagenesis during acute and chronic metabolic acidosis in dog and rat.
Kidney Int. 17, 312-325 (1980).
- VINAY, P., KHOURY, N., SOOWAMBER, M., GOUGOUX, A.
Renal extraction of glutamine from plasma and whole blood: studies in dogs and rats.

- Can.J.Physiol.Pharmacol. 63, 886-892 (1985).
- VINAY,P.,MEMIEUX,G.,GOUGOUX,A.,HALPERIN,M.
Regulation of glutamine metabolism in dog kidney in vivo.
Kidney Int. 29, 68-79 (1986).

 - WAGENMAKERS,A.J.M.,SALDEN,H.J.M.,VEERKAMP,J.H.
The metabolic fate of branched-chain amino acids and 2-oxo acids in rat muscle homogenates and diaphragms.
Int.J.Biochem. 17, 957-965 (1985).

 - WAHREN,J.,FELIG,P.,HAGENFELDT,L.
Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal men and in patients with diabetes mellitus.
J.Clin.Invest. 57, 987-999 (1976)

 - WATFORD,M.,SMITH,E.M.,ERBELDING,E.J.
The regulation of phosphate-activated glutaminase activity and glutamine metabolism in the streptozotocin-diabetic rat.
Biochem.J. 224, 207-214 (1984).

 - WEBER,F.L.,MADDREY,W.C.,WALSER,M.
Amino acid metabolism of dog jejunum before and during absorption of keto analogues.
Am.J.Physiol. 232, E263-E269 (1977).

 - WEIGENBERG,A.M.,BLOSTEIN,R.
Na⁺-coupled glycine transport in reticulocyte vesicles of distinct sidedness: stoichiometry and symmetry.
J.Membrane Biol. 86, 37-44 (1985).

 - WELBOURNE,T.C.
Effect of metabolic acidosis on hindquarter glutamine and alanine release.
Metabolism 35, 614-618 (1986).

 - WELBOURNE,T.C.,PHROMPHETCHARAT,V.,GIVENS,G.,JOSHI,S.
Regulation of interorganal glutamine flow in metabolic acidosis.
Am.J.Physiol. 250, E457-E463 (1986).

- WHEELER, K. P.
Amino acid transport by resealed ghosts from pigeon erythrocytes.
Biochem.J. 202, 613-621 (1982).
- WHEELER, K. P., CHRISTENSEN, H. N.
Interdependent fluxes of amino acids and sodium ion in the pigeon red blood cell.
J. Biol. Chem. 242, 3782-3788 (1967a).
- WHEELER, K. P., CHRISTENSEN, H. N.
Role of Na⁺ in the transport of amino acids in rabbit red cells.
J. Biol. Chem. 242, 1450-1457 (1967b).
- WHITE, M. F., CHRISTENSEN, H. N.
Cationic amino acid transport into cultured animal cells.
J. Biol. Chem. 257, 4450-4457 (1982).
- WINDMUELLER, H. G.
Enterohepatic aspects of glutamine metabolism.
a: Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. Mora, J., Palacios, R. eds. Academic Press. New York 235-257 (1980).
- WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E.
Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine.
J. Biol. Chem. 249, 5070-5079 (1974).
- WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E.
Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels "in vivo" for postabsorptive rat small intestine.
J. Biol. Chem. 253, 69-76 (1978).
- WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E.
Respiratory fuels and nitrogen metabolism "in vivo" in small intestine of fed rats: quantitative importance of glutamine, glutamate and aspartate.
J. Biol. Chem. 255, 107-112 (1980).
- WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E.

- Source and fate of circulating citrulline.
Am.J.Physiol. 241, E473-E480 (1981).
- WINTER, C.G., CHRISTENSEN, H.N.
 Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte.
J.Biol.Chem. 239, 872-878 (1964).
 - WINTER, C.G., CHRISTENSEN, H.N.
 Contrasts in neutral amino acid transport by rabbit erythrocytes and reticulocytes.
J.Biol.Chem. 240, 3594-3600 (1965).
 - WISE, W.C.
 Maturation of membrane function: Transport of amino acid by rat erythroid cells.
J.Cell.Physiol. 87, 199-212 (1975).
 - WYATT, D.G.
 Blood flow and blood velocity measurement in vivo by electromagnetic induction.
Med.Biol.Eng.Comp. 22, 193-211 (1984).
 - WOHLHUETER, R.M., HARPER, A.E.
 Coinduction of rat liver branched chain keto acid dehydrogenase activities.
J.Biol.Chem. 245, 2391-2401 (1970).
 - WOLFF, J.E., BERGMAN, E.N.
 Gluconeogenesis from plasma aminoacids in fed sheep.
Am.J.Physiol. 223, 455-460 (1972).
 - WOLFROM, G.W., ASPLUND, J.M.
 Effect of different lysing and washing methods on free amino acid concentrations of sheep whole blood and erythrocytes.
Clin.Biochem. 9, 180-193 (1976).
 - WONG, K.-L., TYCE, G.M.
 Glucose and amino acid metabolism in rat brain during sustained hypoglycemia.
Neurochem.Res. 8, 401-415 (1983).

- YAMAMOTO, H., AIKAWA, T., MATSUTAKA, H., OKUDA, T., ISHIKAWA, E.
Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats.
Am.J.Physiol. 226, 1428-1433 (1974).
- YOUNG, J.A., FREEDMAN, B.S.
Renal tubular transport of amino acids.
Clin.Chem. 17, 245-266 (1971).
- YOUNG, J.D., ELLORY, J.C.,
Substrate specificity of amino acid transport in sheep erythrocytes.
Biochem.J. 162, 33-38 (1977).
- YOUNG, J.D., ELLORY, J.C., TUCKER, E.M.
Amino acid transport in normal and glutathione-deficient sheep erythrocytes.
Biochem.J. 154, 43-48 (1976).
- YOUNG, J.D., JONES, S.E.M., ELLORY, J.C.
Amino acid transport in human and in sheep erythrocytes.
Proc.R.Soc.Lond.B 209, 355-375 (1980).
- YOUNG, J.D., WOLOWYK, M.W., JONES, S.M., ELLORY, J.C.
Red cell amino acid transport: evidence for the presence of system ASC in mature red blood cells.
Biochem.J. 216, 349-357 (1983).
- YOUNG, V.R., MUNRO, H.N.
Plasma and tissue tryptophan levels in relation to tryptophan requirements of weanling and adult rats.
J.Nutr. 103, 1756-1763 (1973).
- YUNIS, A.A., ARIMURA, G.K.
Amino acid transport in blood cells. II. Patterns of transport of some amino acids in mammalian reticulocytes and mature red blood cells.
J.Lab.Clin.Med. 66, 177-186 (1965).
- YUNIS, A.A., ARIMURA, G.K., KIPNIS, D.M.
Amino acid transport in blood cells. I. Effect of cations on amino acid transport in human leukocytes.
J.Lab.&Clin.Med. 62, 465-471 (1963).